

P21289.P03

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant :H. ENDO et al.

Appl No. : Not Yet Assigned

PCT Branch

I.A. Filed : January 28, 2000

PCT/JP00/00472

For :PROCESS FOR PRODUCING HMG-CoA REDUCTASE INHIBITORS

CLAIM OF PRIORITY


Commissioner of Patents and Trademarks

Washington, D.C. 20231

Sir:

Applicant hereby claims the right of priority granted pursuant to 35 U.S.C. 119 based upon Japanese Application No.11-21707, filed January 29, 1999. The International Bureau already should have sent a certified copy of the Japanese application to the United States designated office. If the certified copy has not arrived, please contact the undersigned.

Respectfully submitted,
H. ENDO et al.


Bruce H. Bernstein
Reg. No. 29,027

July 26, 2001
GREENBLUM & BERNSTEIN, P.L.C.
1941 Roland Clarke Place
Reston, VA 20191
(703) 716-1191

Reg No 33,049

The first part of the paper discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions. It is essential for the business to have a clear and concise record of all income and expenses, as this will be necessary for the preparation of the tax return. The second part of the paper discusses the importance of keeping up to date with the latest tax laws and regulations. It is essential for the business to be aware of any changes in the law, as this will ensure that the business is compliant with the law and can avoid any penalties. The third part of the paper discusses the importance of seeking professional advice. It is essential for the business to consult with a qualified professional, such as a tax accountant, to ensure that the business is following the correct procedures and is aware of any potential risks. The fourth part of the paper discusses the importance of keeping up to date with the latest accounting software. It is essential for the business to use the latest software, as this will ensure that the business is able to keep accurate records of all transactions and is able to generate the necessary reports for the tax return. The fifth part of the paper discusses the importance of keeping up to date with the latest tax forms. It is essential for the business to use the latest forms, as this will ensure that the business is able to provide the necessary information to the tax authorities. The sixth part of the paper discusses the importance of keeping up to date with the latest tax rates. It is essential for the business to be aware of any changes in the tax rates, as this will ensure that the business is able to calculate the correct amount of tax to pay. The seventh part of the paper discusses the importance of keeping up to date with the latest tax credits. It is essential for the business to be aware of any changes in the tax credits, as this will ensure that the business is able to claim the correct amount of credit. The eighth part of the paper discusses the importance of keeping up to date with the latest tax deductions. It is essential for the business to be aware of any changes in the tax deductions, as this will ensure that the business is able to claim the correct amount of deduction. The ninth part of the paper discusses the importance of keeping up to date with the latest tax exemptions. It is essential for the business to be aware of any changes in the tax exemptions, as this will ensure that the business is able to claim the correct amount of exemption. The tenth part of the paper discusses the importance of keeping up to date with the latest tax reliefs. It is essential for the business to be aware of any changes in the tax reliefs, as this will ensure that the business is able to claim the correct amount of relief. The eleventh part of the paper discusses the importance of keeping up to date with the latest tax allowances. It is essential for the business to be aware of any changes in the tax allowances, as this will ensure that the business is able to claim the correct amount of allowance. The twelfth part of the paper discusses the importance of keeping up to date with the latest tax rebates. It is essential for the business to be aware of any changes in the tax rebates, as this will ensure that the business is able to claim the correct amount of rebate. The thirteenth part of the paper discusses the importance of keeping up to date with the latest tax refunds. It is essential for the business to be aware of any changes in the tax refunds, as this will ensure that the business is able to claim the correct amount of refund. The fourteenth part of the paper discusses the importance of keeping up to date with the latest tax credits. It is essential for the business to be aware of any changes in the tax credits, as this will ensure that the business is able to claim the correct amount of credit. The fifteenth part of the paper discusses the importance of keeping up to date with the latest tax deductions. It is essential for the business to be aware of any changes in the tax deductions, as this will ensure that the business is able to claim the correct amount of deduction. The sixteenth part of the paper discusses the importance of keeping up to date with the latest tax exemptions. It is essential for the business to be aware of any changes in the tax exemptions, as this will ensure that the business is able to claim the correct amount of exemption. The seventeenth part of the paper discusses the importance of keeping up to date with the latest tax reliefs. It is essential for the business to be aware of any changes in the tax reliefs, as this will ensure that the business is able to claim the correct amount of relief. The eighteenth part of the paper discusses the importance of keeping up to date with the latest tax allowances. It is essential for the business to be aware of any changes in the tax allowances, as this will ensure that the business is able to claim the correct amount of allowance. The nineteenth part of the paper discusses the importance of keeping up to date with the latest tax rebates. It is essential for the business to be aware of any changes in the tax rebates, as this will ensure that the business is able to claim the correct amount of rebate. The twentieth part of the paper discusses the importance of keeping up to date with the latest tax refunds. It is essential for the business to be aware of any changes in the tax refunds, as this will ensure that the business is able to claim the correct amount of refund.

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

28.01.00

REC'D 17 MAR 2000

WIPO

PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1999年 1月29日

出 願 番 号

Application Number:

平成11年特許願第021707号

出 願 人

Applicant (s):

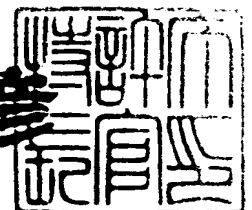
協和醗酵工業株式会社

PRIORITY
DOCUMENTSUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17 OF THE PCT

2000年 3月 3日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近藤 隆彦



出証番号 出証特2000-3011576

【書類名】 特許願

【整理番号】 H11-0011T4

【提出日】 平成11年 1月29日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/60

【発明者】

【住所又は居所】 東京都町田市旭町 3 丁目 6 番 6 号 協和醗酵工業株式会
社 東京研究所内

【氏名】 遠藤 博文

【発明者】

【住所又は居所】 東京都町田市旭町 3 丁目 6 番 6 号 協和醗酵工業株式会
社 東京研究所内

【氏名】 米谷 良之

【発明者】

【住所又は居所】 東京都町田市旭町 3 丁目 6 番 6 号 協和醗酵工業株式会
社 東京研究所内

【氏名】 溝口 寛

【発明者】

【住所又は居所】 東京都町田市旭町 3 丁目 6 番 6 号 協和醗酵工業株式会
社 東京研究所内

【氏名】 橋本 信一

【発明者】

【住所又は居所】 東京都町田市旭町 3 丁目 6 番 6 号 協和醗酵工業株式会
社 東京研究所内

【氏名】 尾崎 明夫

【特許出願人】

【識別番号】 000001029

【氏名又は名称】 協和醗酵工業株式会社

【代表者】 平田 正

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 008187

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

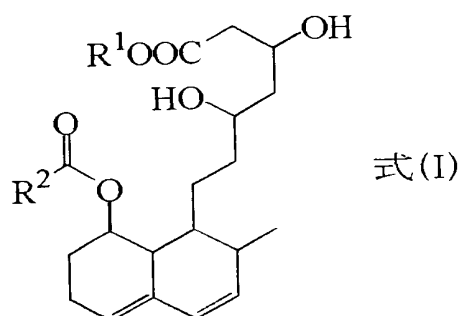
【書類名】 明細書

【発明の名称】 HMG-CoAレダクターゼ阻害剤の製造法

【特許請求の範囲】

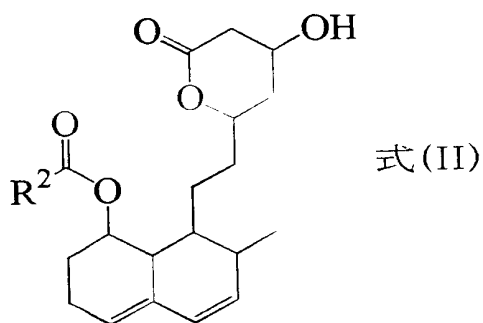
【請求項 1】 Bacillus属に属する微生物由来でかつ、式 (I)

【化 1】



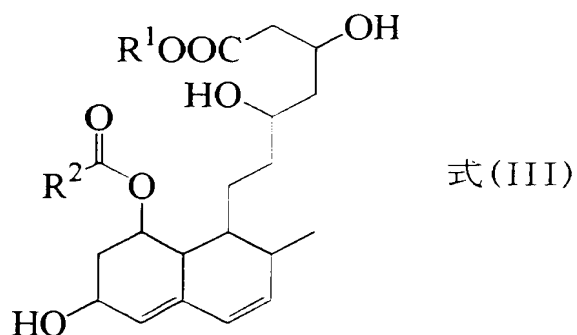
(式中、R¹は水素原子、置換もしくは非置換のアルキルまたはアルカリ金属を表し、R²は置換もしくは非置換のアルキルまたはアリールを表す) で表される化合物 [以下、化合物 (I-a) という] または式 (II)

【化 2】



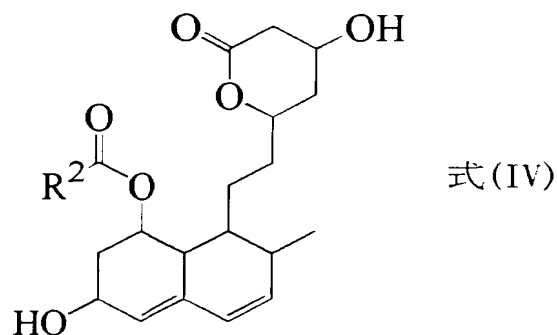
(式中、R²は前記と同義を表す) で表される、化合物 (I-a) の閉鎖ラクトン体 [以下、化合物 (I-b) という] から、式 (III)

【化3】



(式中、 R^1 および R^2 は前記と同義を表す)で表される化合物〔以下、化合物 (II-a) という〕または式 (IV)

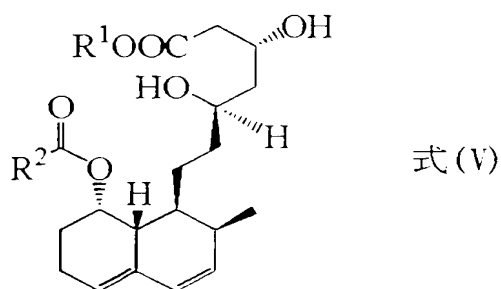
【化4】



(式中、 R^2 は前記と同義を表す)で表される、化合物 (II-a) の閉鎖ラクトン体〔以下、化合物 (II-b) という〕を生成する活性を有する蛋白質。

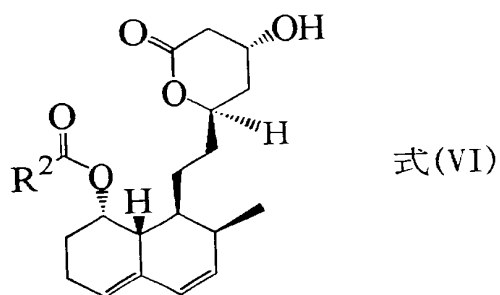
【請求項2】 Bacillus属に属する微生物由来でかつ、式 (V)

【化5】



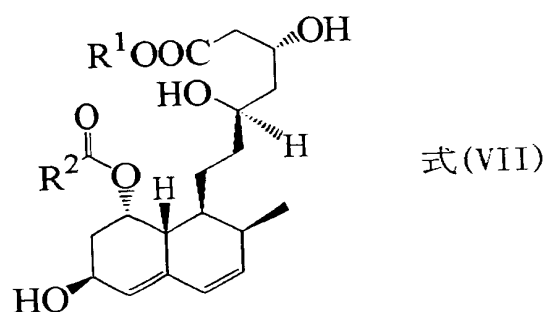
(式中、 R^1 および R^2 は前記と同義を表す)で表される化合物〔以下、化合物 (III-a) という〕または式 (VI)

【化6】



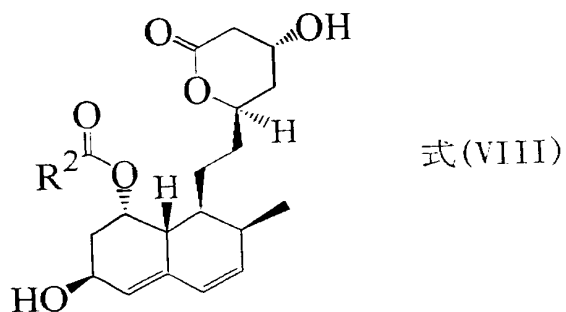
(式中、 R^2 は前記と同義を表す)で表される、化合物(III-a)の閉鎖ラクトン体〔以下、化合物(III-b)という〕から、式(VII)

【化7】



(式中、 R^1 および R^2 は前記と同義を表す)で表される化合物〔以下、化合物(IV-a)という〕または式(VIII)

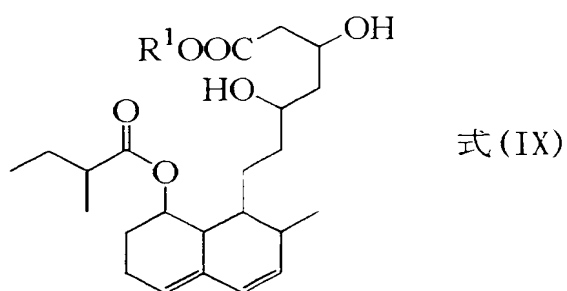
【化8】



(式中、 R^2 は前記と同義を表す)で表される、化合物(IV-a)の閉鎖ラクトン体〔以下、化合物(IV-b)という〕を生成する活性を有する蛋白質。

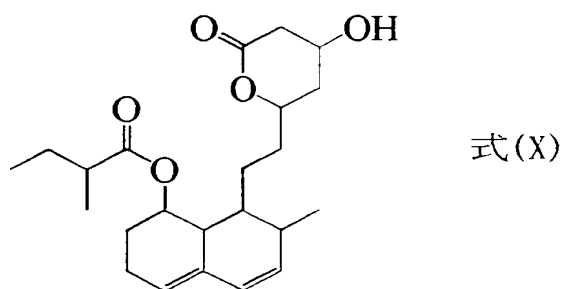
【請求項3】 Bacillus属に属する微生物由来でかつ、式(IX)

【化 9】



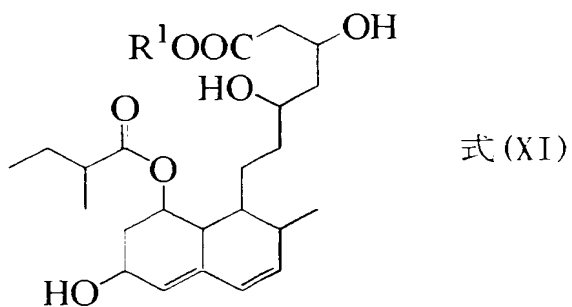
(式中、R¹は前記と同義を表す) で表される化合物 [以下、化合物 (V-a) という] または式 (X)

【化 10】



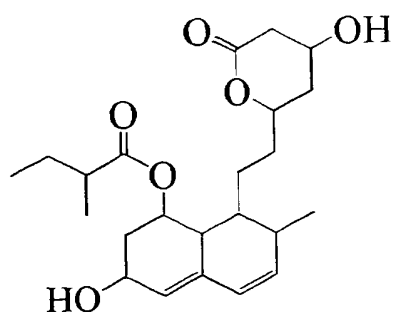
で表される、化合物 (V-a) の閉鎖ラクトン体 [以下、化合物 (V-b) という] から、式 (XI)

【化 11】



(式中、R¹は前記と同義を表す) で表される化合物 [以下、化合物 (VI-a) という] または式 (XII)

【化 12】

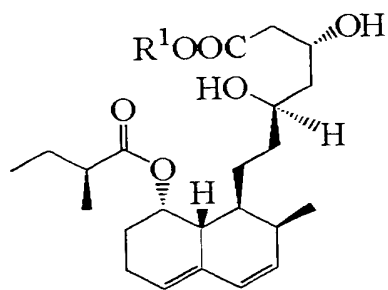


式(XII)

で表される、化合物 (VI-a) の閉鎖ラクトン体 [以下、化合物 (VI-b) という] を生成する活性を有する蛋白質。

【請求項 4】 Bacillus 属に属する微生物由来でかつ、式 (XIII)

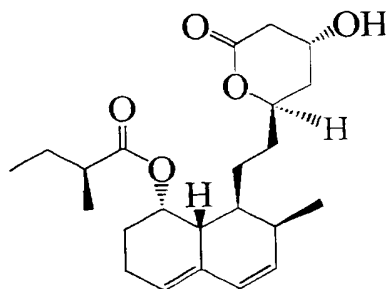
【化 13】



式(XIII)

(式中、 R^1 は前記と同義を表す) で表される化合物 [以下、化合物 (VII-a) という] または式 (XIV)

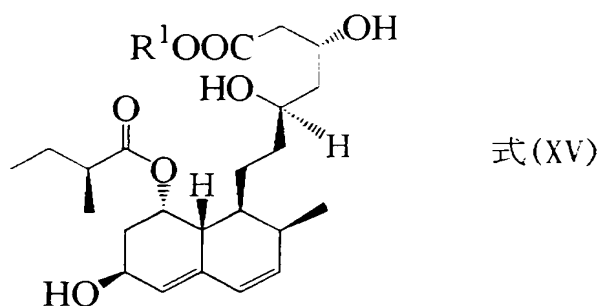
【化 14】



式(XIV)

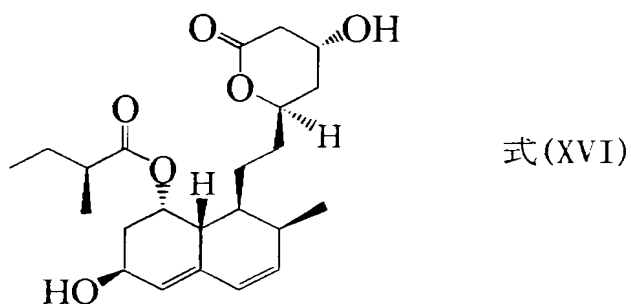
で表される、化合物 (VII-a) の閉鎖ラクトン体 [以下、化合物 (VII-b) という] から、式 (XV)

【化 15】



(式中、 R^1 は前記と同義を表す) で表される化合物 [以下、化合物 (VIII-a) という] または式 (XVI)

【化 16】



で表される、化合物 (VIII-a) の閉鎖ラクトン体 [以下、化合物 (VIII-b) という] を生成する活性を有する蛋白質。

【請求項 5】 Bacillus属に属する微生物が B. subtilis、B. megaterium、B. laterosporus、B. sphaericus、B. pumilus、B. stearothermophilus、B. cereus、B. badius、B. brevis、B. alvei、B. circulans、および B. macerans から選ばれる微生物である、請求項 1～4 いずれか 1 項に記載の蛋白質。

【請求項 6】 Bacillus属に属する微生物が B. subtilis ATCC6051株、B. megaterium ATCC10778株、B. megaterium ATCC11562株、B. megaterium ATCC13402株、B. megaterium ATCC15177株、B. megaterium ATCC15450株、B. megaterium ATCC19213株、B. megaterium IAM1032株、B. laterosporus ATCC4517株、B. pumilus FERM BP-2064株、B. badius ATCC14574株、B. brevis NRRL B-8029株、B. alvei ATCC6344株、B. circulans NTCT-2610株、および B. macerans NCIMB-9668株から選ばれる微生物である、請求項 1～5 いずれか

1 項に記載の蛋白質。

【請求項 7】 Bacillus属に属する微生物がBacillus sp. FERM BP-6029株、およびBacillus sp. FERM BP-6030株から選ばれる微生物である、請求項 1～5 いずれか 1 項に記載の蛋白質。

【請求項 8】 配列番号 1 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質。

【請求項 9】 配列番号 1 記載のアミノ酸配列から 1 以上のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列を有し、かつ化合物 (I-a) または化合物 (I-b) から化合物 (II-a) または化合物 (II-b) を生成する活性を有する蛋白質。

【請求項 10】 化合物 (I-a) が化合物 (III-a) であり、化合物 (I-b) が化合物 (III-b) であり、化合物 (II-a) が化合物 (IV-a) であり、化合物 (II-b) が化合物 (IV-b) である、請求項 9 記載の蛋白質。

【請求項 11】 化合物 (I-a) が化合物 (V-a) であり、化合物 (I-b) が化合物 (V-b) であり、化合物 (II-a) が化合物 (VI-a) であり、化合物 (II-b) が化合物 (VI-b) である、請求項 9 記載の蛋白質。

【請求項 12】 化合物 (I-a) が化合物 (VII-a) であり、化合物 (I-b) が化合物 (VII-b) であり、化合物 (II-a) が化合物 (VIII-a) であり、化合物 (II-b) が化合物 (VIII-b) である、請求項 9 記載の蛋白質。

【請求項 13】 配列番号 2 記載の塩基配列を有する、単離された DNA。

【請求項 14】 請求項 1～12 のいずれかの蛋白質をコードする、単離された DNA。

【請求項 15】 請求項 13 または 14 記載の DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ化合物 (I-a) または化合物 (I-b) から化合物 (II-a) または化合物 (II-b) を生成する活性を有する蛋白質をコードする、単離された DNA。

【請求項 16】 化合物 (I-a) が化合物 (III-a) であり、化合物 (I-b) が化合物 (III-b) であり、化合物 (II-a) が化合物 (IV-a) であり、化合物 (II-b) が化合物 (IV-b) である、請求項 15 記載の DNA。

【請求項 17】 化合物 (I-a) が化合物 (V-a) であり、化合物 (I-b) が化合物 (V-b) であり、化合物 (II-a) が化合物 (VI-a) であり、化合物 (II-b) が

化合物 (VI-b) である、請求項 15 記載の DNA。

【請求項 18】 化合物 (I-a) が化合物 (VII-a) であり、化合物 (I-b) が化合物 (VII-b) であり、化合物 (II-a) が化合物 (VIII-a) であり、化合物 (II-b) が化合物 (VIII-b) である、請求項 15 記載の DNA。

【請求項 19】 請求項 13～18 のいずれかに記載の DNA を含む組換え DNA ベクター。

【請求項 20】 請求項 19 記載の組換え DNA ベクターを宿主細胞に導入し得られる形質転換体。

【請求項 21】 宿主細胞が Escherichia 属、Bacillus 属、Corynebacterium 属、および Streptomyces 属から選ばれる微生物に属する、請求項 20 記載の形質転換体。

【請求項 22】 宿主細胞が Escherichia coli、Bacillus subtilis、Bacillus megaterium、Corynebacterium glutamicum、Corynebacterium ammoniagenes、および Streptomyces lividans から選ばれる微生物に属する微生物である、請求項 20 または 21 記載の形質転換体。

【請求項 23】 請求項 20～22 のいずれかに記載の形質転換体、該形質転換体の培養物または該培養物の処理物を酵素源として用い、化合物 (I-a) または化合物 (I-b) を水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に化合物 (II-a) または化合物 (II-b) を生成、蓄積させ、該水性媒体から化合物 (II-a) または化合物 (II-b) を採取することを特徴とする、化合物 (II-a) または化合物 (II-b) の製造法。

【請求項 24】 請求項 20～22 のいずれかに記載の形質転換体、該形質転換体の培養物または該培養物の処理物を酵素源として用い、化合物 (III-a) または化合物 (III-b) を水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に化合物 (IV-a) または化合物 (IV-b) を生成、蓄積させ、該水性媒体から化合物 (IV-a) または化合物 (IV-b) を採取することを特徴とする、化合物 (IV-a) または化合物 (IV-b) の製造法。

【請求項 25】 請求項 20～22 のいずれかに記載の形質転換体、該形質転換体の培養物または該培養物の処理物を酵素源として用い、化合物 (V-a) また

は化合物(V-b)を水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に化合物(VI-a)または化合物(VI-b)を生成、蓄積させ、該水性媒体から化合物(VI-a)または化合物(VI-b)を採取することを特徴とする、化合物(VI-a)または化合物(VI-b)の製造法。

【請求項 2 6】 請求項 2 0 ~ 2 2 のいずれかに記載の形質転換体、該形質転換体の培養物または該培養物の処理物を酵素源として用い、化合物(VII-a)または化合物(VII-b)を水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に化合物(VIII-a)または化合物(VIII-b)を生成、蓄積させ、該水性媒体から化合物(VIII-a)または化合物(VIII-b)を採取することを特徴とする、化合物(VIII-a)または化合物(VIII-b)の製造法。

【請求項 2 7】 化合物(II-b)が、化合物(II-a)よりラク톤を形成させて得られた化合物(II-b)である、請求項 2 3 記載の製造法。

【請求項 2 8】 化合物(II-a)が、化合物(II-b)のラク톤を開環させて得られた化合物(II-a)である、請求項 2 3 記載の製造法。

【請求項 2 9】 化合物(IV-b)が、化合物(IV-a)よりラク톤を形成させて得られた化合物(IV-b)である、請求項 2 4 記載の製造法。

【請求項 3 0】 化合物(IV-a)が、化合物(IV-b)のラク톤を開環させて得られた化合物(IV-a)である、請求項 2 4 記載の製造法。

【請求項 3 1】 化合物(VI-b)が、化合物(VI-a)よりラク톤を形成させて得られた化合物(VI-b)である、請求項 2 5 記載の製造法。

【請求項 3 2】 化合物(VI-a)が、化合物(VI-b)のラク톤を開環させて得られた化合物(VI-a)である、請求項 2 5 記載の製造法。

【請求項 3 3】 化合物(VIII-b)が、化合物(VIII-a)よりラク톤を形成させて得られた化合物(VIII-b)である、請求項 2 6 記載の製造法。

【請求項 3 4】 化合物(VIII-a)が、化合物(VIII-b)のラク톤を開環させて得られた化合物(VIII-a)である、請求項 2 6 記載の製造法。

【請求項 3 5】 形質転換体の培養物の処理物が、培養菌体、該菌体の乾燥物、該菌体の凍結乾燥物、該菌体の界面活性剤処理物、該菌体の酵素処理物、該菌体の超音波処理物、該菌体の機械的摩砕物、該菌体の溶媒処理物等の菌体処理物

、菌体の蛋白分画物、菌体および菌体処理物の固定化物から選ばれる処理物である、請求項 23～26 いずれかに記載の製造法。

【請求項 36】 請求項 20～22 のいずれかに記載の形質転換体を培地に培養し、培養物中に請求項 1～12 のいずれかに記載の蛋白質を生成、蓄積させ、該培養物から該蛋白質を採取することを特徴とする、該蛋白質の製造法。

【請求項 37】 配列番号 2 に示された塩基配列中の連続した 5～60 塩基からなる配列に相当するオリゴヌクレオチドまたは該オリゴヌクレオチドと相補的な配列に相当するオリゴヌクレオチド。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本願発明は、ヒドロキシメチルグルタリル CoA (HMG-CoA) レダクターゼを阻害し、血清コレステロールの低下作用を有する化合物の製造に関わる DNA および該 DNA を用いた該化合物の製造法に関する。

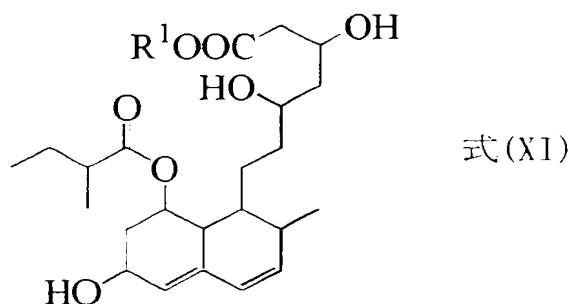
【0002】

【従来の技術】

式 (XI)

【0003】

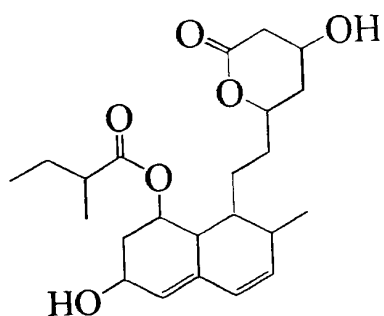
【化 17】



(式中、 R^1 は水素原子、置換もしくは非置換のアルキルまたはアルカリ金属を表す) で表される化合物 [以下、化合物 (VI-a) という] または式 (XII)

【0004】

【化 1 8】



式(XII)

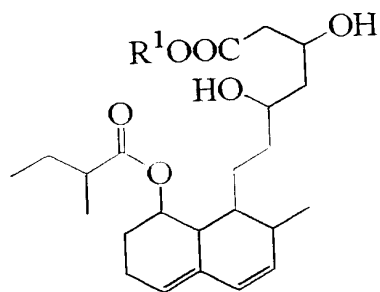
で表される、化合物 (VI-a) の閉鎖ラクトン体 [以下、化合物 (VI-b) という] は、HMG-C o A レダクターゼを阻害し、血清コレステロールの低下作用等を示すことが知られている [ザ・ジャーナル・オブ・アンチバイオチクス (The Journal of Antibiotics) 29, 1346(1976)]。

【0 0 0 5】

微生物によって、式 (IX)

【0 0 0 6】

【化 1 9】

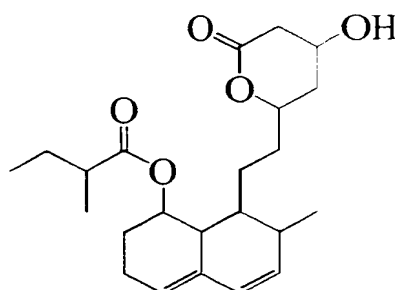


式(IX)

(式中、 R^1 は前記と同義を表す) で表される化合物 [以下、化合物 (V-a) という] または式 (X)

【0 0 0 7】

【化 2 0】



式(X)

で表される、化合物 (V-a) の閉鎖ラクトン体 [以下、化合物 (V-b) という] から化合物 (VI-a) または化合物 (VI-b) を生成する方法に関しては既に幾つかの報告がある。

【0 0 0 8】

即ち、[特開昭 5 7 - 5 0 8 9 4] には糸状菌を用いる方法が、[特開平 7 - 1 8 4 6 7 0] [WO 9 6 / 4 0 8 6 3] には放線菌を用いる方法が、また [特許第 26 72551 号] には遺伝子組換え放線菌を用いる方法が述べられている。しかし、よく知られているように糸状菌や放線菌は菌糸を伸ばして成長するため、発酵槽で増殖させると培養液の粘度が上昇する。

このため酸素が不足しやすく、培養液が不均一になるため反応効率の低下を招きやすい。この酸素不足を解消し、培養液を均一に保つためには、発酵槽の攪拌速度を上げなければならないが、攪拌速度を上げると菌糸が剪断され、微生物の活性が低下しやすい [発酵工学の基礎、p 1 6 9 ~ 1 9 0, P.F. Stansbury, A. Whitaker 著、学会出版センター (1 9 8 8)]。

【0 0 0 9】

【発明が解決しようとする課題】

本願発明の目的は、新規な水酸化酵素をコードする DNA およびヒドロキシメチルグルタリル CoA (HMG-CoA) レダクターゼを阻害し、血清コレステロールの低下作用を有する化合物の工業的に有利な製造法を提供することにある。

【0 0 1 0】

【課題を解決するための手段】

本願発明者らは、菌糸を形成しない微生物により、化合物 (I-a) または化合物 (I-b) の水酸化を行うことができれば、菌糸形成による培養液の不均一化にともなう反応効率の低下等の不都合を回避でき、工業的に有利であると考え、鋭意検討した結果、本願発明を完成するに至った。

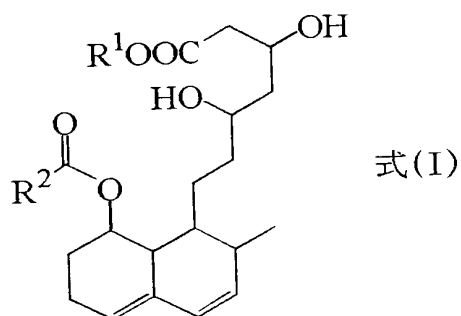
即ち、本願発明は、以下 (1) ~ (37) に関する。

【0011】

(1) 本願の第1の発明は、Bacillus属に属する微生物由来でかつ、式 (I)

【0012】

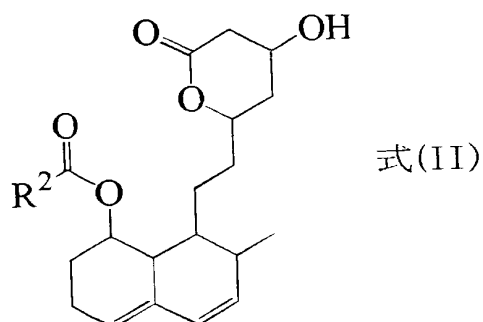
【化21】



(式中、R¹は水素原子、置換もしくは非置換のアルキルまたはアルカリ金属を表し、R²は置換もしくは非置換のアルキルまたはアリールを表す) で表される化合物 [以下、化合物 (I-a) という] または式 (II)

【0013】

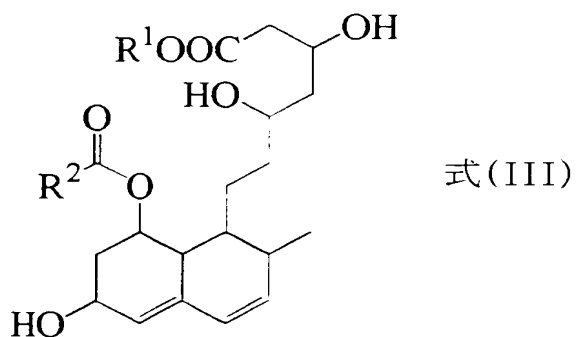
【化22】



(式中、R²は前記と同義を表す) で表される、化合物 (I-a) の閉鎖ラクトン体 [以下、化合物 (I-b) という] から、式 (III)

【0014】

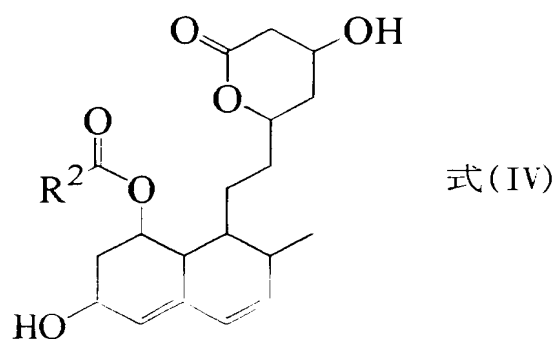
【化 23】



(式中、R¹およびR²は前記と同義を表す)で表される化合物〔以下、化合物 (II-a) という〕または式 (IV)

【0015】

【化 24】



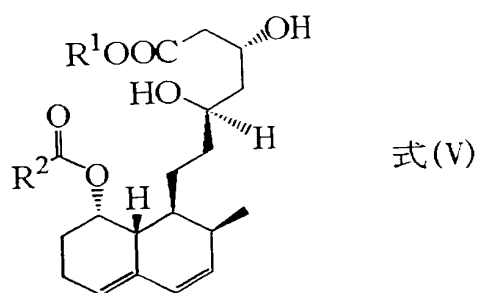
(式中、R²は前記と同義を表す)で表される、化合物 (II-a) の閉鎖ラクトン体〔以下、化合物 (II-b) という〕を生成する活性を有する蛋白質である。

【0016】

(2) 本願の第2の発明は、Bacillus属に属する微生物由来でかつ、式 (V)

【0017】

【化 25】

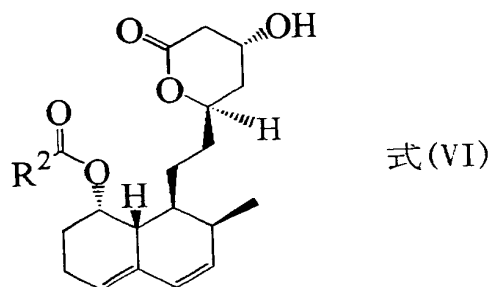


式(V)

(式中、R¹およびR²は前記と同義を表す)で表される化合物〔以下、化合物 (III-a) という〕または式 (VI)

【0018】

【化 26】

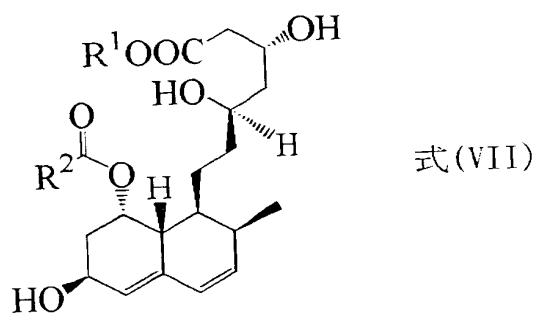


式(VI)

(式中、R²は前記と同義を表す)で表される、化合物 (III-a) の閉鎖ラクトン体〔以下、化合物 (III-b) という〕から、式 (VII)

【0019】

【化 27】

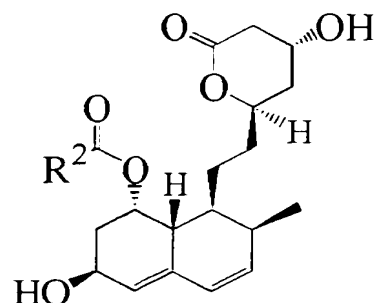


式(VII)

(式中、R¹およびR²は前記と同義を表す)で表される化合物〔以下、化合物 (IV-a) という〕または式 (VIII)

【0020】

【化28】



式(VIII)

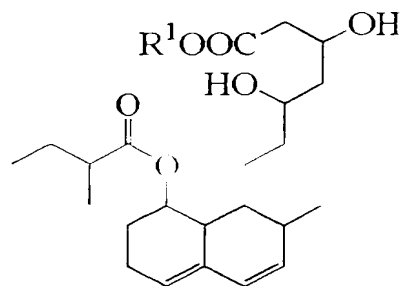
(式中、 R^2 は前記と同義を表す)で表される、化合物(IV-a)の閉鎖ラクトン体〔以下、化合物(IV-b)という〕を生成する活性を有する蛋白質である。

【0021】

(3) 本願の第3の発明は、Bacillus属に属する微生物由来でかつ、式(IX)

【0022】

【化29】

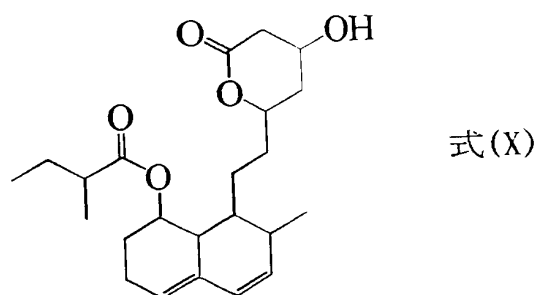


式(IX)

(式中、 R^1 は前記と同義を表す)で表される化合物〔以下、化合物(V-a)という〕または式(X)

【0023】

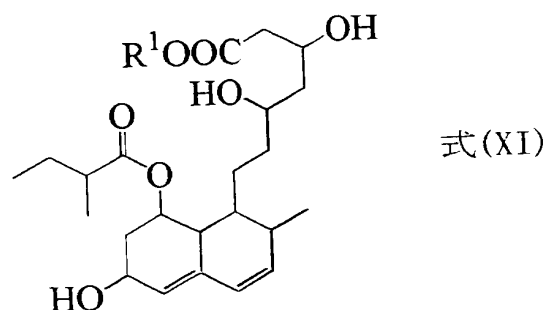
【化 30】



で表される、化合物 (V-a) の閉鎖ラクトン体 [以下、化合物 (V-b) という] から、式 (XI)

【0024】

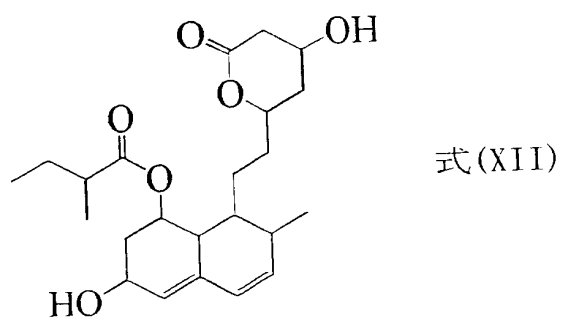
【化 31】



(式中、 R^1 は前記と同義を表す) で表される化合物 [以下、化合物 (VI-a) という] または式 (XII)

【0025】

【化 32】



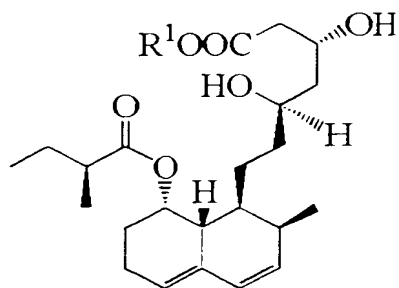
で表される、化合物 (VI-a) の閉鎖ラクトン体 [以下、化合物 (VI-b) という] を生成する活性を有する蛋白質である。

【 0 0 2 6 】

(4) 本願の第 4 の発明は、Bacillus 属に属する微生物由来でかつ、式 (XIII)

【 0 0 2 7 】

【 化 3 3 】

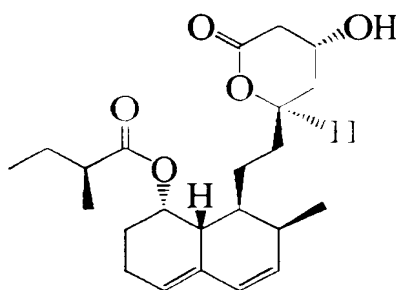


式 (XIII)

(式中、 R^1 は前記と同義を表す) で表される化合物 [以下、化合物 (VII-a) という] または式 (XIV)

【 0 0 2 8 】

【 化 3 4 】

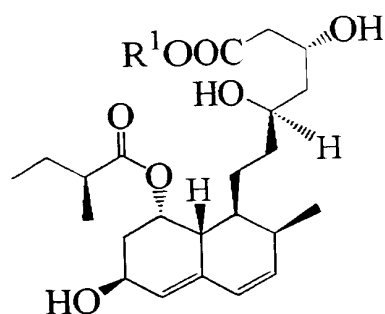


式 (XIV)

で表される、化合物 (VII-a) の閉鎖ラクトン体 [以下、化合物 (VII-b) という] から、式 (XV)

【 0 0 2 9 】

【化35】

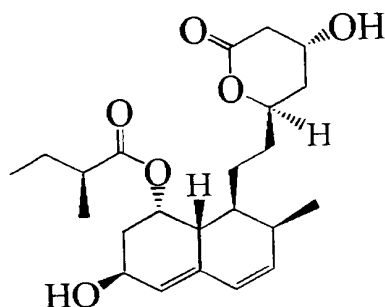


式(XV)

(式中、 R^1 は前記と同義を表す)で表される化合物[以下、化合物(VIII-a)という]または式(XVI)

【0030】

【化36】



式(XVI)

で表される、化合物(VIII-a)の閉鎖ラクトン体[以下、化合物(VIII-b)という]を生成する活性を有する蛋白質である。

【0031】

(5) 本願の第5の発明は、Bacillus属に属する微生物がB. subtilis、B. megaterium、B. laterosporus、B. sphaericus、B. pumilus、B. stearotherophilus、B. cereus、B. badius、B. brevis、B. alvei、B. circulans、およびB. maceransから選ばれる微生物である、(1)～(4)いずれか1項に記載の蛋白質である。

【0032】

(6) 本願の第6の発明は、Bacillus属に属する微生物がB. subtilis ATCC6051株、B. megaterium ATCC10778株、B. megaterium ATCC11562株、B. megaterium ATCC13402株、B. megaterium ATCC15177株、B. megaterium ATCC15450株、B. m

egaterium ATCC19213株、B. megaterium IAM1032株、B. laterosporus ATCC4517株、B. pumilus FERM BP-2064株、B. badius ATCC14574株、B. brevis NRRL B-8029株、B. alvei ATCC6344株、B. circulans NTCT-2610株、およびB. macerans NCIMB-9368株から選ばれる微生物である、(1)～(5)いずれか1項に記載の蛋白質である。

【0033】

(7) 本願の第7の発明は、Bacillus属に属する微生物がBacillus sp. FERM B P-6029株、およびBacillus sp. FERM BP-6030株から選ばれる微生物である、(1)～(5)いずれか1項に記載の蛋白質である。

【0034】

(8) 本願の第8の発明は、配列番号1記載のアミノ酸配列を有する蛋白質である。

【0035】

(9) 本願の第9の発明は、配列番号1記載のアミノ酸配列から1以上のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列を有し、かつ化合物(I-a)または化合物(I-b)から化合物(II-a)または化合物(II-b)を生成する活性を有する蛋白質である。

上記記載の、アミノ酸の欠失、置換もしくは付加は、出願前周知技術である部位特異的変異誘発法により実施することができ、また、1以上のアミノ酸とは、部位特異的変異誘発法により欠失、置換もしくは付加できる程度の数のアミノ酸を意味する。

【0036】

かかる1以上のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなる蛋白質は、モレキュラー・クローニング：ア・ラボラトリー・マニュアル(Molecular Cloning, A laboratory manual)、第二版〔サンプブルック(Sambrook)、フリッチ(Fritsch)、マニアチス(Maniatis)編集、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス(Cold Spring Harbor Laboratory Press)、1989年刊(以下、モレキュラー・クローニング 第二版と略す)〕、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997)(以下カレント・

プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーと略す)、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79, 6409(1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci USA, 82, 488 (1985)等に記載の方法に準じて調製することができる。

具体的な例として、配列番号 2 記載の塩基配列を有する DNA 等をあげることができる。

【0037】

(10) 本願の第 10 の発明は、化合物 (I-a) が化合物 (III-a) であり、化合物 (I-b) が化合物 (III-b) であり、化合物 (II-a) が化合物 (IV-a) であり、化合物 (II-b) が化合物 (IV-b) である、(9) 記載の蛋白質である。

【0038】

(11) 本願の第 11 の発明は、化合物 (I-a) が化合物 (V-a) であり、化合物 (I-b) が化合物 (V-b) であり、化合物 (II-a) が化合物 (VI-a) であり、化合物 (II-b) が化合物 (VI-b) である、(9) 記載の蛋白質である。

【0039】

(12) 本願の第 12 の発明は、化合物 (I-a) が化合物 (VII-a) であり、化合物 (I-b) が化合物 (VII-b) であり、化合物 (II-a) が化合物 (VIII-a) であり、化合物 (II-b) が化合物 (VIII-b) である、(9) 記載の蛋白質である。

【0040】

(13) 本願の第 13 の発明は、配列番号 2 記載の塩基配列を有する、単離された DNA である。

【0041】

(14) 本願の第 14 の発明は、(1) ~ (12) のいずれかの蛋白質をコードする、単離された DNA である。

【0042】

(15) 本願の第 15 の発明は、(13) または (14) 記載の DNA とストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつ化合物 (I-a) または化合物 (I-b) から化合物 (II-a) または化合物 (II-b) を生成する活性を有する蛋白質を

コードする、単離されたDNAである。

上記記載の「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA」とは、上記のDNAまたは該DNAの断片をプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、プラークハイブリダイゼーション法、あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られるDNAを意味し、具体的には、コロニーあるいはプラーク由来のDNAまたは該DNAの断片を固定化したフィルターを用いて、0.7～1.0MのNaCl存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1～2倍濃度のSSC溶液（1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mM塩化ナトリウム、15mMクエン酸ナトリウムよりなる）を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるDNAをあげることができる。

ハイブリダイゼーションは、モレキュラー・クローニング 第二版等に記載されている方法に準じて行うことができる。ハイブリダイズ可能なDNAとして、具体的には配列番号2、3、4および5から選ばれる塩基配列と少なくとも70%以上の相同性を有するDNA、好ましくは90%以上の相同性を有するDNAをあげることができる。

【0043】

(16) 本願の第16の発明は、化合物(I-a)が化合物(III-a)であり、化合物(I-b)が化合物(III-b)であり、化合物(II-a)が化合物(IV-a)であり、化合物(II-b)が化合物(IV-b)である、(15)記載のDNAである。

【0044】

(17) 本願の第17の発明は、化合物(I-a)が化合物(V-a)であり、化合物(I-b)が化合物(V-b)であり、化合物(II-a)が化合物(VI-a)であり、化合物(II-b)が化合物(VI-b)である、(15)記載のDNAである。

【0045】

(18) 本願の第18の発明は、化合物(I-a)が化合物(VII-a)であり、化合物(I-b)が化合物(VII-b)であり、化合物(II-a)が化合物(VIII-a)であり、化合物(II-b)が化合物(VIII-b)である、(15)記載のDNAである。

【0046】

(19) 本願の第19の発明は、(13)～(18)のいずれかに記載のDNAを含む組換えDNAベクターである。

【0047】

(20) 本願の第20の発明は、(19)記載の組換えDNAベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換体である。

【0048】

(21) 本願の第21の発明は、宿主細胞がEscherichia属、Bacillus属、Corynebacterium属、およびStreptomyces属から選ばれる微生物に属する、(20)記載の形質転換体である。

【0049】

(22) 本願の第22の発明は、宿主細胞がEscherichia coli、Bacillus subtilis、Bacillus megaterium、Corynebacterium glutamicum、Corynebacterium ammoniagenes、およびStreptomyces lividansから選ばれる微生物に属する微生物である、(20)または(21)記載の形質転換体である。

【0050】

(23) 本願の第23の発明は、(20)～(22)のいずれかに記載の形質転換体、該形質転換体の培養物または該培養物の処理物を酵素源として用い、化合物(I-a)または化合物(I-b)を水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に化合物(II-a)または化合物(II-b)を生成、蓄積させ、該水性媒体から化合物(II-a)または化合物(II-b)を採取することを特徴とする、化合物(II-a)または化合物(II-b)の製造法である。

【0051】

(24) 本願の第24の発明は、(20)～(22)のいずれかに記載の形質転換体、該形質転換体の培養物または該培養物の処理物を酵素源として用い、化合物(III-a)または化合物(III-b)を水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に化合物(IV-a)または化合物(IV-b)を生成、蓄積させ、該水性媒体から化合物(IV-a)または化合物(IV-b)を採取することを特徴とする、化合物(IV-a)または化合物(IV-b)の製造法である。

【0052】

(25) 本願の第25の発明は、(20)～(22)のいずれかに記載の形質転換体、該形質転換体の培養物または該培養物の処理物を酵素源として用い、化合物(V-a)または化合物(V-b)を水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に化合物(VI-a)または化合物(VI-b)を生成、蓄積させ、該水性媒体から化合物(VI-a)または化合物(VI-b)を採取することを特徴とする、化合物(VI-a)または化合物(VI-b)の製造法である。

【0053】

(26) 本願の第26の発明は、(20)～(22)のいずれかに記載の形質転換体、該形質転換体の培養物または該培養物の処理物を酵素源として用い、化合物(VII-a)または化合物(VII-b)を水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に化合物(VIII-a)または化合物(VIII-b)を生成、蓄積させ、該水性媒体から化合物(VIII-a)または化合物(VIII-b)を採取することを特徴とする、化合物(VIII-a)または化合物(VIII-b)の製造法である。

【0054】

(27) 本願の第27の発明は、化合物(II-b)が、化合物(II-a)よりラク톤を形成させて得られた化合物(II-b)である、(23)記載の製造法である。

【0055】

(28) 本願の第28の発明は、化合物(II-a)が、化合物(II-b)のラク톤を開環させて得られた化合物(II-a)である、(23)記載の製造法である。

【0056】

(29) 本願の第29の発明は、化合物(IV-b)が、化合物(IV-a)よりラク톤を形成させて得られた化合物(IV-b)である、(24)記載の製造法である。

【0057】

(30) 本願の第30の発明は、化合物(IV-a)が、化合物(IV-b)のラク톤を開環させて得られた化合物(IV-a)である、(24)記載の製造法である。

【0058】

(31) 本願の第31の発明は、化合物(VI-b)が、化合物(VI-a)よりラク

トン形成させて得られた化合物 (VI-b) である、(25) 記載の製造法である。

【0059】

(32) 本願の第32の発明は、化合物 (VI-a) が、化合物 (VI-b) のラクトンを開環させて得られた化合物 (VI-a) である、(25) 記載の製造法である。

【0060】

(33) 本願の第33の発明は、化合物 (VIII-b) が、化合物 (VIII-a) よりラクトン形成させて得られた化合物 (VIII-b) である、(26) 記載の製造法である。

【0061】

(34) 本願の第34の発明は、化合物 (VIII-a) が、化合物 (VIII-b) のラクトンを開環させて得られた化合物 (VIII-a) である、(26) 記載の製造法である。

【0062】

(35) 本願の第35の発明は、形質転換体の培養物の処理物が、培養菌体、該菌体の乾燥物、該菌体の凍結乾燥物、該菌体の界面活性剤処理物、該菌体の酵素処理物、該菌体の超音波処理物、該菌体の機械的摩砕物、該菌体の溶媒処理物等の菌体処理物、菌体の蛋白分画物、菌体および菌体処理物の固定化物から選ばれる処理物である、(23) ~ (26) いずれかに記載の製造法である。

【0063】

(36) 本願の第36の発明は、(20) ~ (22) いずれかに記載の形質転換体を培地に培養し、培養物中に (1) ~ (12) のいずれかに記載の蛋白質を生成、蓄積させ、該培養物から該蛋白質を採取することを特徴とする、該蛋白質の製造法である。

【0064】

(37) 本願の第37の発明は、配列番号2に示された塩基配列中の連続した5~60塩基からなる配列に相当するオリゴヌクレオチドまたは該オリゴヌクレオチドと相補的な配列に相当するオリゴヌクレオチドである。

【0065】

【発明の実施の形態】

以下、本願発明を詳細に説明する。

I. 本願発明のDNAの取得

既に公開されている枯草菌の染色体の塩基配列情報

[<http://www.pasteur.fr/Bio/Subtilist.html>] および該塩基配列より推定された枯草菌のyjiB遺伝子情報を利用し、本願発明のDNAをPCR法[Science, 230, 1350(1985)]によりクローニングし、取得することができる。

【0066】

具体的には以下の方法により取得することができる。

枯草菌、例えばB. subtilis ATCC15563株を枯草菌に適した培地、例えばLB液体培地[バクトトリプトン(ディフコ社製) 10g、酵母エキス(ディフコ社製) 5g、NaCl 5gを水1リットルに含みpH 7.2に調整した培地]を用い、常法に従って培養する。

【0067】

培養後、培養物より遠心分離により菌体を取得する。

取得した菌体より公知の方法(例えば、モレキュラー・クローニング 第二版)に従い染色体DNAを単離する。

配列番号2に記載された塩基配列情報を利用し、本願発明の蛋白質をコードするDNA領域に対応する塩基配列を含有するセンスプライマーおよびアンチセンスプライマーをDNA合成機を用いて合成する。

【0068】

PCR法により増幅後、該増幅DNA断片をプラスミドに導入可能とするために、センスプライマーおよびアンチセンスプライマーの5'末端には適切な制限酵素サイト、例えばBamHI、EcoRI等の制限酵素サイトを付加させることが好ましい。

【0069】

該センスプライマー、アンチセンスプライマーの組合せとしては、例えば、配列番号3および4の組合せの塩基配列を有するDNA等をあげることができる。

染色体DNAを鋳型として、これらプライマー、TaKaRa LA-PCR™ Kit Ver.

2(宝酒造社製)またはExpand™ High-Fidelity PCR System(パーリンガー・マンハイム社製)等を用い、DNA Thermal Cycler(パーキンエルマー・ジャパン社製)でPCRを行う。

【0070】

PCRの条件として、上記プライマーが2 kb以下のDNA断片の場合には94℃で30秒間、55℃で30秒～1分間、72℃で2分間からなる反応工程を1サイクルとして、2 kbを超えるDNA断片の場合には98℃で20秒間、68℃で3分間からなる反応工程を1サイクルとして、30サイクル行った後、72℃で7分間反応させる条件をあげることができる。

【0071】

増幅された該DNA断片を、上記プライマーで付与した制限酵素サイトと同じサイトで切断後、アガロース電気泳動、シュクロース密度勾配超遠心分離等の手法によりDNA断片を分画・回収する。

【0072】

該回収DNA断片を用い、常法、例えば、モレキュラー・クローニング 第二版、Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1~38, John Wiley & Sons (1987-1997)(以下、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー サプリメントと略す)、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University Press (1995)等に記載された方法、あるいは市販のキット、例えばSuperScript Plasmid System for cDNA A Synthesis and Plasmid Cloning (ライフ・テクノロジーズ社製)やZAP-cDNA Synthesis Kit [ストラタジーン (Stratagene)社製]を用いクローニングベクターを作製し、作製した該クローニングベクターを用い、大腸菌、例えばE. coli DH5α株(東洋紡より購入可能)を形質転換する。

【0073】

該大腸菌を形質転換するためのクローニングベクターとしては、大腸菌K12株中で自律複製できるものであれば、ファージベクター、プラスミドベクター等いずれでも使用できる、大腸菌の発現用ベクターをクローニングベクターとして用いてもよい。具体的には、ZAP Express [ストラタジーン社製、Strategies, 5,

58 (1992)]、pBluescript II SK(+) [Nucleic Acids Research, 17, 9494 (1989)]、Lambda ZAP II (ストラタジーン社製)、 λ gt10、 λ gt11 [DNA Cloning, A Practical Approach, 1, 49 (1985)]、 λ TriplEx (クローンテック社製)、 λ ExCell (ファルマシア社製)、pT7T318U (ファルマシア社製)、pcD2 [H.Okayama and P.Berg; Mol. Cell. Biol., 3, 280 (1983)]、pMW218 (和光純薬社製)、pUC118、pSTV28 (宝酒造社製)、pEG400 [J. Bac., 172, 2392 (1990)]、pHMV1520 (MoBiTec社製)、pQE-30 (QIAGEN社製)等をあげることができる。

【0074】

得られた形質転換株より、目的とするDNAを含有したプラスミドを常法、例えば、モレキュラー・クローニング 第二版、Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1~38, John Wiley & Sons (1987-1997)、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University Press (1995)等に記載された方法により取得することができる。

【0075】

該方法により、化合物(I-a)または化合物(I-b)から化合物(II-a)または化合物(II-b)を生成する反応を触媒する蛋白質をコードするDNAを含むプラスミドを取得することができる。

該プラスミドとして、例えば、後述の実施例で構築したpSyj1Eをあげることができる。

【0076】

上記の方法とは別に、適当なベクターを用いて大腸菌を宿主として枯草菌の染色体ライブラリーを作成し、このライブラリーの各株について化合物(I-a)または化合物(I-b)から化合物(II-a)または化合物(II-b)を生成する活性を調べる方法でも、化合物(I-a)または化合物(I-b)から化合物(II-a)または化合物(II-b)を生成する反応を触媒する蛋白質をコードするDNAを含むプラスミドを取得することができる。

【0077】

上記により得られた遺伝子の塩基配列などを利用して他の原核生物あるいは植物から該DNAのホモログを上記と同様の方法により取得することができる。

【0078】

上述の方法で取得した本発明のDNAおよびDNA断片を用い、常法により本発明のDNAの一部の配列を有するアンチセンス・オリゴヌクレオチド、センス・オリゴヌクレオチド等のオリゴヌクレオチド、あるいはRNAを含むオリゴヌクレオチドを調製することができる。また、上記で得られたDNA配列情報をもとに、上記のDNA合成機を用いて、これらオリゴヌクレオチドを合成することができる。

【0079】

該オリゴヌクレオチドとしては、上記DNAの有する塩基配列中の連続した5～60塩基と同じ配列を有するDNAまたは該DNAと相補的な配列を有するDNAをあげることができる。またこれらDNAと相補的な配列を有するRNAも本発明のオリゴヌクレオチドである。

【0080】

該オリゴヌクレオチドとして、例えば、配列番号2で表される塩基配列中の連続した5～60塩基と同じ配列を有するDNAまたは該DNAと相補的な配列を有するDNAをあげることができる。センスプライマーおよびアンチセンスプライマーとして用いる場合には、両者の融解温度(T_m)および塩基数が極端に変わることはない上記記載のオリゴヌクレオチドが好ましい。具体的には、配列番号3～30に示された塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをあげることができる。

更に、これらオリゴヌクレオチドの誘導体（以下、誘導体オリゴヌクレオチドという）も本発明のオリゴヌクレオチドとして利用することができる。

【0081】

誘導体オリゴヌクレオチドとしては、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスフォロチオエート結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN 3'-P 5'ホスフォアミデート結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合がペプチド核酸結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5プロピニルウラシルで置換され

た誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5チアゾールウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC-5プロピニルシトシンで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン (phenoxazine-modified cytosine) で置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリボースが2'-O-プロピルリボースで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、あるいはオリゴヌクレオチド中のリボースが2'-メトキシエトキシリボースで置換された誘導体オリゴヌクレオチド等をあげることができる〔細胞工学, 16, 1463 (1997)〕。

【0082】

II. 化合物 (I-a) または化合物 (I-b) から化合物 (II-a) または化合物 (II-b) を生成する反応を触媒する蛋白質の製造法

上記のようにして得られたDNAを宿主細胞中で発現させるためには、まず、目的とする該DNA断片を、制限酵素類あるいはDNA分解酵素類で、該遺伝子を含む適当な長さのDNA断片とした後に、発現ベクター中プロモーターの下流に挿入し、次いで該発現ベクターを、発現ベクターに適合した宿主細胞中に導入する。

【0083】

宿主細胞としては、細菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞等、目的とする遺伝子を発現できるものは全て用いることができる。

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能ないしは染色体中への組込みが可能で、上記目的とするDNAを転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

【0084】

細菌等の原核生物を宿主細胞として用いる場合は、上記DNAを発現させるための発現ベクターは該細胞中で自立複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、上記DNAおよび転写終結配列より構成された組換えベクターであることが好ましい。プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

【 0 0 8 5 】

発現ベクターとしては、例えば、pBTrp2、pBTac1、pBTac2（いずれもベーリンガーマンハイム社より市販）、pKK233-2（Pharmacia社製）、pSE280（Invitrogen社製）、pGEMEX-1（Promega社製）、pQE-8（QIAGEN社製）、pQE-30（QIAGEN社製）、pKYP10（特開昭58-110600）、pKYP200 [Agricultural Biological Chemistry, 48, 669 (1984)]、pLSA1 [Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)]、pGEL1 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4306 (1985)]、pBluescriptII SK+、pBluescriptII SK(-) (Stratagene社製)、pTrs30(FERMBP-5407)、pTrs32(FERM BP-5408)、pGEX (Pharmacia社製)、pET-3 (Novagen社製)、pTerm2(US4686191、US 4939094、US5160735)、pSupex、pUB110、pTP5、pC194、pUC18 [gene, 33, 103 (1985)]、pUC19 [Gene, 33, 103 (1985)]、pSTV28(宝酒造社製)、pSTV29(宝酒造社製)、pUC118(宝酒造社製)、pPA1(特開昭63-233798)、pEG400 [J. Bacteriol., 172, 2392(1990)]、pQE-30 (QIAGEN社製)、PHY300(宝酒造社製)、pHW1520 (MoBiTec社製) 等を例示することができる。

【 0 0 8 6 】

プロモーターとしては、宿主細胞中で発現できるものであればいかなるものでもよい。例えば、trpプロモーター (P trp)、lacプロモーター (P lac)、PLプロモーター、PRプロモーター、PSEプロモーター等の、大腸菌やファージ等に由来するプロモーター、SP01プロモーター、SP02プロモーター、penPプロモーター等をあげることができる。またP trpを2つ直列させたプロモーター (P trp × 2)、tacプロモーター、letIプロモーター、lacT7プロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。さらにBacillus属細菌中で発現させるためのxylAプロモーターやCorynebacterium属細菌中で発現させるためのP54-1プロモーターなども用いることができる。

【 0 0 8 7 】

リボソーム結合配列としては、宿主細胞中で発現できるものであればいかなるものでもよいが、シャイン-ダルガノ (Shine-Dalgarno) 配列と開始コドンとの間を適当な距離 (例えば6～18塩基) に調節したプラスミドを用いることが好ましい。

【0088】

転写・翻訳を効率的に行なうため、化合物(I-a)または化合物(I-b)から化合物(II-a)または化合物(II-b)を生成する反応を触媒する蛋白質のN末端またはその一部を欠失した蛋白質と発現ベクターのコードする蛋白質のN末端部分を融合させた蛋白質を発現させてもよい。このような例として例えば後述の実施例で構築したpWyjiBがあげられる。

【0089】

目的とするDNAの発現には転写終結配列は必ずしも必要ではないが、好適には構造遺伝子直下に転写終結配列を配置することが望ましい。

原核生物としては、Escherichia属、Corynebacterium属、Brevibacterium属、Bacillus属、Microbacterium属、Serratia属、Pseudomonas属、Agrobacterium属、Alicyclobacillus属、Anabaena属、Anacystis属、Arthrobacter属、Azotobacter属、Chromatium属、Erwinia属、Methylobacterium属、Phormidium属、Rhodobacter属、Rhodopseudomonas属、Rhodospirillum属、Streptomyces属、Synechococcus属、Zymomonas属等に属する微生物をあげることができ、好ましくは、Escherichia属、Corynebacterium属、Brevibacterium属、Bacillus属、Pseudomonas属、Agrobacterium属、Alicyclobacillus属、Anabaena属、Anacystis属、Arthrobacter属、Azotobacter属、Chromatium属、Erwinia属、Methylobacterium属、Phormidium属、Rhodobacter属、Rhodopseudomonas属、Rhodospirillum属、Streptomyces属、Synechococcus属、Zymomonas属に属する微生物等をあげることができる。

【0090】

該微生物の具体例として、例えば、Escherichia coli XL1-Blue、Escherichia coli XL2-Blue、Escherichia coli DH1、Escherichia coli DH5 α 、Escherichia coli MC1000、Escherichia coli KY3276、Escherichia coli W1485、Escherichia coli JM109、Escherichia coli HB101、Escherichia coli No.49、Escherichia coli W3110、Escherichia coli NY49、Escherichia coli MP347、Escherichia coli NM522、Bacillus subtilis ATCC33712、Bacillus megaterium、Bacillus sp. FERM BP-6036、Bacillus amyloliquefaciens、Brevibacterium ammonia

genes, Brevibacterium immariophilum ATCC14068, Brevibacterium saccharolyticum ATCC14066, Brevibacterium flavum ATCC14067, Brevibacterium lactofermentum ATCC13869, Corynebacterium glutamicum ATCC13032, Corynebacterium glutamicum ATCC14297, Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870, Microbacterium ammoniophilum ATCC15354, Serratia ficaria, Serratia fonticola, Serratia liquefaciens, Serratia marcescens, Pseudomonas sp. D-0110, Agrobacterium radiobacter, Agrobacterium rhizogenes, Agrobacterium rubi, Anabaena cylindrica, Anabaena doliolum, Anabaena flos-aquae, Arthrobacter aurescens, Arthrobacter citreus, Arthrobacter globiformis, Arthrobacter hydrocarboglutamicus, Arthrobacter mysorens, Arthrobacter nicotianae, Arthrobacter paraffineus, Arthrobacter protophormiae, Arthrobacter roseoparraffinus, Arthrobacter sulfureus, Arthrobacter ureafaciens, Chromatium buderii, Chromatium tepidum, Chromatium vinosum, Chromatium warmingii, Chromatium fluviatile, Erwinia uredovora, Erwinia carotovora, Erwinia ananas, Erwinia herbicola, Erwinia punctata, Erwinia terreus, Methylobacterium rhodesianum, Methylobacterium extorquens, Phormidium sp. ATCC29409, Rhodobacter capsulatus, Rhodobacter sphaeroides, Rhodopseudomonas blastica, Rhodopseudomonas marina, Rhodopseudomonas palustris, Rhodospirillum rubrum, Rhodospirillum salexigens, Rhodospirillum salinarum, Streptomyces ambofaciens, Streptomyces aureofaciens, Streptomyces aureus, Streptomyces fungicidicus, Streptomyces griseochromogenes, Streptomyces griseus, Streptomyces lividans, Streptomyces olivogriseus, Streptomyces rameus, Streptomyces tanashiensis, Streptomyces vinaceus, Zymomonas mobilis等をあげることができる。

【0091】

組換えベクターの導入方法としては、上記宿主細胞へDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、カルシウムイオンを用いる方法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)〕、プロトプラスト法（特開昭63-2483942）、エレクトロポレーション法またはGene, 17, 107 (1982)やMolecular

& General Genetics, 168, 111 (1979)に記載の方法等をあげることができる。

【0092】

酵母を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YEp 13 (ATCC37115)、YEp 24 (ATCC37051)、Y Cp 50 (ATCC37419)、pHS 19、pHS 15等を例示することができる。

プロモーターとしては、酵母中で発現できるものであればいかなるものでもよく、例えば、PHO 5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター、gal 1プロモーター、gal 10プロモーター、ヒートショック蛋白質プロモーター、MF α 1プロモーター、CUP 1プロモーター等のプロモーターをあげることができる。

【0093】

酵母菌株としては、Saccharomyces cerevisiae、Schizosaccharomyces pombe、Kluyveromyces lactis、Trichosporon pullulans、Schwanniomyces alluvius等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Methods Enzymol., 194, 182 (1990)、スフェロプラスト法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978)]、酢酸リチウム法 [J. Bacteriol., 153, 103 (1983)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978)] 記載の方法等をあげることができる。

【0094】

動物細胞を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、pcDNA1、pcDM8 (フナコシ社より市販)、pAGE 107 [特開平3-22979; Cytotechnology, 3, 133, (1990)]、pAS 3-3 (特開平2-227075)、pCDM8 [Nature, 329, 840, (1987)]、pcDNA1/Amp (Invitrogen社製)、pREP 4 (Invitrogen社製)、pAGE 103 [J. Biochem., 101, 1307 (1987)]、pAGE 210等をあげることができる。

【0095】

プロモーターとしては、動物細胞中で発現できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス (ヒトCMV) のIE (immediate

early) 遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、SR α プロモーター等をあげることができる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

【0096】

動物細胞としては、ナマルバ細胞、HB T5637（特開昭63-299）、COS1細胞、COS7細胞、CHO細胞等をあげることができる。

動物細胞への組換えベクターの導入法としては、動物細胞にDNAを導入できるいかなる方法も用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法〔Cytotechnology, 3, 133(1990)〕、リン酸カルシウム法（特開平2-227075）、リポフェクション法〔Proc.Natl.Acad.Sci.,USA, 84, 7413(1987)、Virology, 52, 456 (1973)〕に記載の方法等を用いることができる。形質転換体の取得および培養は、特開平2-227075号公報あるいは特開平2-257891号公報に記載されている方法に準じて行なうことができる。

【0097】

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えばバキュロウイルス・イクスプレッション・ベクターズ・ア・ラボラトリー・マニュアル（Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual）、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー サブルメント1-5 8(1987-1997)、Bio/technology, 6, 47 (1988)等に記載された方法によって、蛋白質を発現することができる。

【0098】

即ち、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、蛋白質を発現させることができる。

【0099】

該方法において用いられる遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393、pBlueBacIII（ともにインビトロジェン社製）等をあげることができる。

バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスである

アウトグラフィ・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス (Autographa californica nuclear polyhedrosis virus) 等を用いることができる。

【0100】

昆虫細胞としては、Spodoptera frugiperda の卵巣細胞である Sf 9、Sf 21 [バキュロウイルス・エクスプレッション・ベクターズ、ア・ラボラトリー・マニュアル、ダブリュー・エイチ・フリーマン・アンド・カンパニー (W. H. Freeman and Company)、ニューヨーク (New York)、(1992)]、Trichoplusia ni の卵巣細胞である High 5 (インビトロジェン社製) 等を用いることができる。

【0101】

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法 (特開平2-227075)、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)] 等をあげることができる。

【0102】

遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、モレキュラー・クローニング第二版に記載されている方法等に準じて、分泌生産、融合蛋白質発現等を行うことができる。

酵母、動物細胞または昆虫細胞により発現させた場合には、糖あるいは糖鎖が付加された蛋白質を得ることができる。

【0103】

以上のようにして得られる形質転換体を培地に培養し、培養物中に化合物 (I-a) または化合物 (I-b) から化合物 (II-a) または化合物 (II-b) を生成する反応を触媒する蛋白質を生成、蓄積させ、該培養物より該蛋白質を採取することにより、化合物 (I-a) または化合物 (I-b) から化合物 (II-a) または化合物 (II-b) を生成する反応を触媒する蛋白質を製造することができる。

【0104】

本願発明の、化合物 (I-a) または化合物 (I-b) から化合物 (II-a) または化合物 (II-b) を生成する反応を触媒する蛋白質製造用の形質転換体を培地に培養

する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

【0105】

本願発明の形質転換体が大腸菌等の原核生物、酵母菌等の真核生物である場合、これら微生物を培養する培地は、該微生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれでもよい。

【0106】

炭素源としては、それぞれの微生物が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含む糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノールなどのアルコール類が用いられる。

【0107】

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム、等の各種無機酸や有機酸のアンモニウム塩、その他含窒素化合物、並びに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスチープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体およびその消化物等が用いられる。

【0108】

無機物としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等が用いられる。

培養は、振盪培養または深部通気攪拌培養などの好気的条件下で行う。培養温度は15～50℃がよく、培養時間は、通常16時間～7日間である。培養中pHは、3.0～9.0に保持する。pHの調整は、無機あるいは有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアなどを用いて行う。

【0109】

また培養中に必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換し

た微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピルーβ-D-チオガラクトピラノシド (IPTG) 等を、trpプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸 (IAA) 等を、xylAプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養する時にはキシロースを、それぞれ培地に添加してもよい。

【0110】

動物細胞を宿主細胞として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているRPMI 1640培地 [The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)]、EagleのMEM培地 [Science, 122, 501 (1952)]、DMEM培地 [Virology, 8, 396 (1959)]、199培地 [Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1(1950)] またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等が用いられる。

【0111】

培養は、通常pH 6～8、30～40℃、5%CO₂存在下等の条件下で1～7日間行う。

また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0112】

昆虫細胞を宿主細胞として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているTNM-FH培地 [Pharmlngen社製]、Sf-900 II SFM培地 (ギブコBRL社製)、ExCell400、ExCell405 [いずれもJRH Biosciences社製]、Grace's Insect Medium [Grace, T.C.C., Nature, 195, 788 (1962)] 等を用いることができる。

【0113】

培養は、通常pH 6～7、25～30℃等の条件下で、1～5日間行う。

また、培養中必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0114】

化合物(I-a)または化合物(I-b)から化合物(II-a)または化合物(II-b)を生成する反応を触媒する蛋白質を本願発明の形質転換体の培養物から単離精製するには、通常の酵素の単離、精製法を用いればよい。

例えば、本願発明の蛋白質が、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し水系緩衝液にけん濁後、超音波破碎機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られた上清から、通常の酵素の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル(DEAE)-セファローース、DIAION HPA-75(三菱化成社製)等レジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF(ファルマシア社製)等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファローース、フェニルセファローース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、精製標品を得ることができ

【0115】

また、該蛋白質が細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回収後破碎し、遠心分離を行うことにより得られた沈殿画分より、通常の方法により該蛋白質を回収後、該蛋白質の不溶体を蛋白質変性剤で可溶化する。該可溶化液を、蛋白質変性剤を含まないあるいは蛋白質変性剤の濃度が蛋白質が変性しない程度に希薄な溶液に希釈、あるいは透析し、該蛋白質を正常な立体構造に構成させた後、上記と同様の単離精製法により精製標品を得ることができる。

【0116】

本願発明の蛋白質あるいはその糖修飾体等の誘導体が細胞外に分泌された場合には、培養上清に該蛋白質あるいはその糖鎖付加体等の誘導体を回収することができる。即ち、該培養物を上記と同様の遠心分離等の手法により処理することにより可溶性画分を取得し、該可溶性画分から、上記と同様の単離精製法を用いる

ことにより、精製標品を得ることができる。

【0117】

このようにして取得される蛋白質として、例えば、配列番号1に示されるアミノ酸配列を有する蛋白質をあげることができる。また、上記方法により発現させた蛋白質を、Fmoc法(フルオレニルメチルオキシカルボニル法)、tBoc法(t-ブチルオキシカルボニル法)等の化学合成法によっても製造することができる。また、桑和貿易(米国Advanced chemTech社製)、パーキンエルマージャパン(米国Perkin-Elmer社製)、ファルマシアバイオテック(スウェーデンPharmacia Biotech社製)、アロカ(米国Protein Technology Instrument社製)、クラボウ(米国Synthec-Cell-Vega社製)、日本パーセプティブ・リミテッド(米国PerSeptive社製)、島津製作所等のペプチド合成機を利用し合成することもできる。

【0118】

III. 化合物(II-a)または化合物(II-b)の製造

上記II. で取得された形質転換体を、上記II. の方法に準じて培養して得られる細胞、該細胞の培養物、該培養物の処理物、または該細胞から抽出した酵素などを酵素源として用い、化合物(I-a)または化合物(I-b)を水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に化合物(II-a)または化合物(II-b)を生成、蓄積させ、該水性媒体中から化合物(II-a)または化合物(II-b)を採取することにより化合物(II-a)または化合物(II-b)を製造することができる。

【0119】

細胞の培養物の処理物としては、該細胞の乾燥物、該細胞の凍結乾燥物、該細胞の界面活性剤処理物、該細胞の酵素処理物、該細胞の超音波破碎物、該細胞の機械的摩砕物、該細胞の溶媒処理物などの細胞処理物、細胞の蛋白質分画物、細胞および細胞処理物の固定化物等があげられる。

【0120】

化合物(I-a)または化合物(I-b)から化合物(II-a)または化合物(II-b)への変換方法は、細胞を培養する培地にあらかじめ化合物(I-a)または化合物(I-b)を添加する方法を用いてもよいし、培養中に化合物(I-a)または化合物(I-b)を添加する方法を用いてもよい。また、細胞を培養して得られた酵素源

を、化合物 (I-a) または化合物 (I-b) に水性媒体中で作用させる方法を用いてもよい。

【0 1 2 1】

化合物 (I-a) または化合物 (I-b) を細胞を培養する培地中に添加する場合、化合物 (I-a) または化合物 (I-b) は培地 1 m l あたり 0.1 ~ 10 mg、好ましくは 0.2 ~ 1 mg を培養の初発または途中に添加する。化合物 (I-a) または化合物 (I-b) は水またはメチルアルコール、エチルアルコール等の有機溶媒に溶解した後培地に添加することが望ましい。

【0 1 2 2】

細胞を培養して得られた酵素源を、化合物 (I-a) または化合物 (I-b) に水性媒体中で作用させる方法を用いる場合、用いる酵素源の量は、当該酵素源の比活性等により異なる。例えば、酵素源として細胞の培養物もしくは細胞またはそれらの処理物を用いる場合は、化合物 (I-a) または化合物 (I-b) 1 m g あたり 5 ~ 1000 m g、好ましくは 10 ~ 400 m g 添加する。反応は水性媒体中 2 0 ~ 5 0 °C で行なうことが好ましく、特に 2 5 °C ~ 3 7 °C で行なうことが好ましい。反応時間は用いる酵素源の量および比活性等により異なるが、通常 2 ~ 150 時間、好ましくは 6 ~ 120 時間である。

【0 1 2 3】

水性媒体としては、水、リン酸緩衝液、HEPES (N-2 ヒドロキシエチルピペラジン-N-エタンスルホン酸) 緩衝液、トリス [トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン] 塩酸緩衝液等の緩衝液があげられる。反応を阻害しなければ該緩衝液に有機溶媒を添加してもよい。有機溶媒としては、アセトン、酢酸エチル、ジメチルスルホキシド、キシレン、メチルアルコール、エチルアルコール、ブタノール等があげられる。有機溶媒と水性媒体との混合液は、例えば化合物 (I-b) を用いる場合好ましく用いられる。

【0 1 2 4】

化合物 (I-a) または化合物 (I-b) を水性媒体に添加する場合、化合物 (I-a) または化合物 (I-b) を溶解することのできる水性媒体に化合物 (I-a) または化合物 (I-b) を溶解し、水性媒体に添加する。反応を阻害しなければ、溶解す

る該水性媒体に有機溶媒を添加してもよい。有機溶媒としては、アセトン、酢酸エチル、ジメチルスルホキシド、キシレン、メチルアルコール、エチルアルコール、ブタノール等があげられる。

【0 1 2 5】

化合物 (I-b) および化合物 (II-b) は下記に例示するラクTONの開環方法により、容易に化合物 (I-a) および化合物 (II-a) にそれぞれ変換することができる。また化合物 (I-a) および化合物 (II-a) は下記に例示するラクTONの生成方法により、容易に化合物 (I-b) および化合物 (II-b) にそれぞれ変換することができる。

【0 1 2 6】

ラクTONの開環方法としては、化合物 (I-b) または化合物 (II-b) を水性媒体に溶解し、酸またはアルカリを添加する方法があげられる。水性媒体としては、例えば水、リン酸緩衝液、トリス緩衝液等反応を阻害しない塩類を含む水溶液があげられる。該水溶液中には、反応を阻害しない濃度のメタノール、エタノール、酢酸エチル等の有機溶媒を含んでいてもよい。酸としては酢酸、塩酸、硫酸等の酸が挙げられ、アルカリとしては、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、アンモニア等があげられる。

【0 1 2 7】

ラクTONの生成方法としては、化合物 (I-a) または化合物 (II-a) を非水系の溶媒に溶解し、酸または塩基触媒を添加する方法があげられる。非水系の溶媒としては実質的に水を含まない有機溶媒で化合物 (I-a) または化合物 (II-a) を溶解できるものならばいかなるものでも用いることができる。非水系の溶媒としては、例えば、ジクロロメタン、酢酸エチル等があげられる。触媒としては、ラクTON化反応を触媒し、基質や反応産物にラクTON化以外の作用を及ぼさないものならば、どのようなものでも用いることができる。該触媒としては、例えば、トリフルオロ酢酸やパラトルエンスルホン酸等があげられる。反応温度は特に制限はないが、0~100℃が好ましく、20~80℃が特に好ましい。

【0 1 2 8】

反応溶液からの化合物 (II-a) または化合物 (II-b) の採取は、通常の有機合

成化学で用いられる方法、例えば、有機溶媒による抽出、結晶化、薄層クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー等により行うことができる。

本願発明により得られる化合物 (II-a) または化合物 (II-b) の確認または定量方法は、化合物 (II-a) および／または化合物 (II-b) を確認または定量できる方法であれば、いずれの方法でも用いられるが、例えば、 ^{13}C -NMRスペクトル、 ^1H -NMRスペクトル、マススペクトル、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 等の方法により行うことができる。

【0129】

本発明において、化合物 (I-a)、化合物 (I-b)、化合物 (II-a) および化合物 (II-b) の中には、光学異性体等の立体異性体が存在し得るものもあるが、本発明は、これらを含め、全ての可能な異性体およびそれらの混合物を包含する。

【0130】

化合物 (I-a) としては、化合物 (III-a) が好ましく、化合物 (V-a) がより好ましく、化合物 (VII-a) が特に好ましい。

化合物 (I-b) としては、化合物 (III-b) が好ましく、化合物 (V-b) がより好ましく、化合物 (VII-b) が特に好ましい。

化合物 (II-a) としては、化合物 (IV-a) が好ましく、化合物 (VI-a) がより好ましく、化合物 (VIII-a) が特に好ましい。

化合物 (II-b) としては、化合物 (IV-b) が好ましく、化合物 (VI-b) がより好ましく、化合物 (VIII-b) が特に好ましい。

【0131】

アルキルとしては、直鎖または分岐状の、炭素数 1～10、好ましくは 1～6 のアルキルであり、例えばメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、ネオペンチル、ヘキシル、イソヘキシル、ヘプチル、4,4-ジメチルペンチル、オクチル、2,2,4-トリメチルペンチル、ノニル、デシル、これら各種分岐鎖異性体等があげられる。

【0132】

アリールとしては、フェニル、ナフチル等があげられる。

置換アルキルにおける置換基としては、ハロゲン、ヒドロキシ、アミノ、アルコキシ、アリール等があげられる

置換アリールにおける置換基としては、ハロゲン、ヒドロキシ、アミノ、アルキル、アルコキシ等があげられる。

【0 1 3 3】

アルコキシにおけるアルキル部分は上述のアルキルと同義である。

アルカリ金属とは、リチウム、ナトリウム、カリウム、ルビジウム、セシウム、フランシウムの各元素を表す。

以下に本願発明の実施例を示すが、本願発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【実施例】

【0 1 3 4】

実施例 1 化合物 (VII-a) または化合物 (VII-b) から化合物 (VIII-a) または化合物 (VIII-b) を生成する活性を有する蛋白質をコードする DNA の取得

化合物 (VII-b) (シグマ社製) 100mg を 9.5ml のメタノールに溶解した後、1 N 水酸化ナトリウム 0.5ml を加えて室温で 1 時間振盪した。えられた反応液を乾固し脱イオン水 5 ml を加えて溶解し 1 N 塩酸約 0.1ml で pH を約 6.5 ~ 7.5 に調整し、さらに脱イオン水 4.9ml を加えることにより最終濃度が 10mg/ml の化合物 (VII-a) [式中 R がナトリウムである化合物] を 10ml 得た。

【0 1 3 5】

Facillus subtilis Marburg 168 株 (ATCC 15568 株) を 1 白金耳、1 0 ml の LB 液体培地に植菌し、3 0 °C で一晚培養した。

培養後、得られた培養液より遠心分離により菌体を取得した。

該菌体より、常法に従い染色体 DNA を単離・精製した。

【0 1 3 6】

配列番号 3 および 4、配列番号 5 および 6、配列番号 7 および 8、配列番号 9 および 1 0、配列番号 1 1 および 1 2、配列番号 1 3 および 1 4、配列番号 1 5 および 1 6 の塩基配列の組合せを有するセンスプライマーおよびアンチセンスプ

ライマーをDNA合成機を用いて合成した。

【0137】

染色体DNAを鋳型として、これらプライマーと、TaKaRa LA-PCR™ Kit Ver.2(宝酒造社製)、Expand™ High-Fidelity PCR System(ベーリンガー・マンハイム社製)またはTaq DNA polymerase (Boehringer社製)を用い、DNA Thermal Cycler(パーキンエルマージャパン社製)でPCRを行った。

【0138】

PCRは、2 kb以下のDNA断片は94℃で30秒間、55℃で30秒～1分間、72℃で2分間からなる反応工程を1サイクルとして、2 kbを超えるDNA断片は98℃で20秒間、68℃で3分間からなる反応工程を1サイクルとして、30サイクル行った後、72℃で7分間反応させる条件で行った。

【0139】

PCRにより増幅されたDNA断片のうち、配列番号3と4のプライマーの組み合わせで増幅されたDNA断片(bioI遺伝子含有)は制限酵素EcoRIと制限酵素SalIで、配列番号5と6のプライマーの組み合わせで増幅されたDNA断片(cypA遺伝子含有)は制限酵素XbaIと制限酵素SmaIで、配列番号7と8のプライマーの組み合わせで増幅されたDNA断片(cypX遺伝子含有)は制限酵素SmaIと制限酵素SalIで、配列番号9と10のプライマーの組み合わせで増幅されたDNA断片(pksS遺伝子含有)は制限酵素EcoRIと制限酵素SalIで、配列番号11と12のプライマーの組み合わせで増幅されたDNA断片(yet0遺伝子含有)は制限酵素XbaIと制限酵素BglIIで、配列番号13と14のプライマーの組み合わせで増幅されたDNA断片(yjiB遺伝子含有)は制限酵素XbaIと制限酵素SmaIで、配列番号15と16(yrhJ遺伝子含有)のプライマーの組み合わせで増幅されたDNA断片は制限酵素XbaIと制限酵素SmaIでそれぞれ消化した。

【0140】

消化後、これら制限酵素処理DNA断片をアガロースゲル電気泳動し、各制限酵素処理DNA断片を取得した。

ベクタープラスミドpUC119(宝酒造社製)を、制限酵素SalIおよびEcoRIで消化後、アガロースゲル電気泳動を行い、SalI-EcoRI処

理 pUC119 断片を取得した。同様にベクタープラスミド pUC119 を、制限酵素 Sal I および Sma I で消化後、アガロースゲル電気泳動を行い、Sal I - Sma I 処理 pUC119 断片を取得した。

【0141】

pSTV28 (宝酒造社製) を制限酵素 XbaI および SmaI で消化後、アガロースゲル電気泳動を行い、XbaI - SmaI 処理 pSTV28 断片を取得した。同様にベクタープラスミド pSTV28 を、制限酵素 XbaI および BamHI で消化後、アガロースゲル電気泳動を行い、XbaI - BamHI 処理 pSTV28 断片を取得した。

【0142】

上記で取得された EcoRI - Sal I 処理 DNA 断片 (配列番号 3 と 4 のプライマーの組みあわせで PCR 増幅) は Sal I - EcoRI 処理 pUC119 断片と、XbaI - SmaI 処理 DNA 断片 (配列番号 5 と 6 のプライマーの組みあわせで PCR 増幅) は XbaI - SmaI 処理 pSTV28 断片と、SmaI - Sal I 処理 DNA 断片 (配列番号 7 と 8 のプライマーの組みあわせで PCR 増幅) は Sal I - SmaI 処理 pUC119 断片と、EcoRI - Sal I 処理 DNA 断片 (配列番号 9 と 10 のプライマーの組みあわせで PCR 増幅) は Sal I - EcoRI 処理 pUC119 断片と、XbaI - BamHI 処理 DNA 断片 (配列番号 11 と 12 のプライマーの組みあわせで PCR 増幅) は XbaI - BamHI 処理 pSTV28 断片と、XbaI - SmaI 処理 DNA 断片 (配列番号 13 と 14 のプライマーの組みあわせで PCR 増幅) は XbaI - SmaI 処理 pSTV28 断片と、XbaI - SmaI 処理 DNA 断片 (配列番号 15 と 16 のプライマーの組みあわせで PCR 増幅) は XbaI - SmaI 処理 pSTV28 断片とそれぞれ混合した後、エタノール沈殿を行い、得られた DNA 沈殿物を 5 μ l の蒸留水に溶解し、ライゲーション反応を行うことにより組換え体 DNA を各々取得した。

【0143】

該組換え体 DNA を用い、E. coli (東洋紡より購入) DH5 α 株を常法に従って形質転換後、該形質転換体を、pUC119 をベクタープラスミドとして用いる

場合はアンピシリン $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ を含む LB 寒天 [1 L 中にバクトトリプトン (ディフコ社製) 10 g、バクトイーストエキストラクト (ディフコ社製) 5 g、NaCl 5 g を含み 1 N NaOH にて pH7.4 に調整、寒天を 1.5% になるように添加] 培地に、pSTV28 をベクタープラスミドとして用いる場合はクロラムフェニコール $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ を含む LB 寒天培地にそれぞれ塗布し、 25°C で 2 日間培養した。

【0144】

生育してきたアンピシリン耐性またはクロラムフェニコール耐性の形質転換体のコロニー数個ずつについて、アンピシリン $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ またはクロラムフェニコール $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ を含む LB 液体培地 [1 L 中にバクトトリプトン (ディフコ社製) 10 g、バクトイーストエキストラクト (ディフコ社製) 5 g、NaCl 5 g を含み、1 N NaOH にて pH7.4 に調整] 10 ml で 25°C 2 日間振盪培養した。

【0145】

得られた培養液を遠心分離することにより菌体を取得した。

該菌体より常法に従ってプラスミドを単離した。

単離した該プラスミドを各種制限酵素で切断して構造を調べ、塩基配列を決定することにより、目的の DNA 断片が挿入されているプラスミドであることを確認した。EcoRI-SalI 処理 DNA 断片 (配列番号 3 と 4 のプライマーの組みあわせで PCR 増幅) と SalI-EcoRI 処理 pUC119 断片を連結して得られたプラスミドを pUbiol、XbaI-SmaI 処理 DNA 断片 (配列番号 5 と 6 のプライマーの組みあわせで PCR 増幅) と XbaI-SmaI 処理 pSTV28 断片を連結して得られたプラスミドを pScypA、SmaI-SalI 処理 DNA 断片 (配列番号 7 と 8 のプライマーの組みあわせで PCR 増幅) と SalI-SmaI 処理 pUC119 断片を連結して得られたプラスミドを pUcypX、EcoRI-SalI 処理 DNA 断片 (配列番号 9 と 10 のプライマーの組みあわせで PCR 増幅) と SalI-EcoRI 処理 pUC119 断片を連結して得られたプラスミドを pUpksS、XbaI-BglII 処理 DNA 断片 (配列番号 11 と 12 のプライマーの組みあわせで PCR 増幅) と XbaI-BamHI 処理 pSTV28 断片を連結して得られたプラスミドを pS

y e t O、X b a l - S m a l 処理 DNA 断片（配列番号 13 と 14 のプライマーの組みあわせで PCR 増幅）と X b a l - S m a l 処理 p S T V 28 断片を連結して得られたプラスミドを p S y j i B、X b a l - S m a l 処理 DNA 断片（配列番号 15 と 16 のプライマーの組みあわせで PCR 増幅）と X b a l - S m a l 処理 p S T V 28 断片を連結して得られたプラスミドを p S y r h J とそれぞれ命名した。

【0146】

こうして得られたプラスミドを含有する大腸菌 DH5 α 、pUC119 または p S T V 28 を含有する大腸菌 DH5 α およびプラスミドを持たない大腸菌 DH5 α をそれぞれ LB 液体培地 3 ml（ベクタープラスミドの有する薬剤耐性遺伝子に対応する薬剤を添加）に植菌し 28℃ で 12 時間振とう培養した。この培養液 0.5 ml をグルコース 1%、CaCO₃ 1% を含む LB 液体培地（薬剤耐性遺伝子に対応する薬剤を添加）に植菌し 28℃ で 12 時間振とう培養した。この培養液 1 ml をアシストチューブ（アシスト社製）に入れ、グルコースと先に得た化合物 (VII-a)（R がナトリウムの化合物）をそれぞれ終濃度 1% および 100 mg/l になるように添加し、28℃ で 24 時間振とう反応した。反応終了後、遠心分離によって菌体を除去し、得られた反応上清に等量の酢酸エチルを加えてよく振とう後、遠心分離によって上層の酢酸エチル層を分離し、遠心エバポレーターにて乾固した。これを最初の培養上清の 1/5 量のメタノールに溶解し、HPLC 分析 [カラム；Inertsil ODS-2 (5 μ m, 4x250mm, ジーエルサイエンス社製)、カラム温度；60℃、移動相；アセトニトリル：水：リン酸=55：45：0.05、流速：0.9 ml/分、検出波長：237 nm] を行ない、化合物 (VIII-a)（式中 R はナトリウムである化合物）の検出、定量を行なった。結果を表 1 に示す。

【0147】

【表1】

表1

| プラスミド | 化合物 (VIII-a) (mg/l) |
|---------|---------------------|
| なし | 0 |
| pUC119 | 0 |
| pSTV28 | 0 |
| pUbioI | 0 |
| pScypA | 0 |
| pUcypX | 0 |
| pUpksS | 0 |
| pSyetO | 0 |
| pSyjiB | 0.6 |
| pSy rhJ | 0 |

実施例2

【0148】

実施例1で取得した各遺伝子を Bacillus subtilis 中に導入し、活性を評価するため配列番号17および18、配列番号19および20、配列番号21および22、配列番号23および24、配列番号25および26、配列番号27および28、配列番号29および30の塩基配列の組合せを有するセンスプライマーおよびアンチセンスプライマーをDNA合成機を用いて合成した。

【0149】

実施例1で取得した枯草菌染色体DNAを鋳型として、これらプライマーと、Takara LA-PCR™ Kit Ver.2(宝酒造社製)、Expand™ High-Fidelity PCR System(パーリンガー・マンハイム社製)またはTaq DNA polymerase (Boehringer社製)を用い、DNA Thermal Cycler(パーキンエルマージャパン社製)でPCRを行った。

【0150】

PCRは、2 kb以下のDNA断片は94℃で30秒間、55℃で30秒～1分間、72℃で2分間からなる反応工程を1サイクルとして、2 kbを超えるDNA断片は98℃で20秒間、68℃で3分間からなる反応工程を1サイクルとして、30サイクル行った後、72℃で7分間反応させる条件で行った。

【0151】

PCRにより増幅されたDNA断片のうち、配列番号17と18のプライマーの組み合わせで増幅されたDNA断片(bioI遺伝子含有)は制限酵素SpeIと制限酵素BamHIで、配列番号19と20のプライマーの組み合わせで増幅されたDNA断片(cypA遺伝子含有)は制限酵素SpeIと制限酵素BamHIで、配列番号21と22のプライマーの組み合わせで増幅されたDNA断片(cypX遺伝子含有)は制限酵素SpeIと制限酵素NruIで、配列番号23と24のプライマーの組み合わせで増幅されたDNA断片(pksS遺伝子含有)は制限酵素SpeIと制限酵素BamHIで、配列番号25と26のプライマーの組み合わせで増幅されたDNA断片(yet0遺伝子含有)は制限酵素SpeIと制限酵素BamHIで、配列番号27と28のプライマーの組み合わせで増幅されたDNA断片(yjiB遺伝子含有)は制限酵素SpeIと制限酵素BamHIで、配列番号29と30(yrhJ遺伝子含有)のプライマーの組み合わせで増幅されたDNA断片は制限酵素SpeIと制限酵素BamHIでそれぞれ消化した。

【0152】

消化後、これら制限酵素処理DNA断片をアガロースゲル電気泳動し、各制限酵素処理DNA断片を取得した。

ベクタープラスミドpWF1520(Mobiled社製)を、制限酵素SpeIおよびBamHIで消化後、アガロースゲル電気泳動を行い、SpeI-BamHI処理pWF1520断片を取得した。同様にベクタープラスミドpWH1520を、制限酵素SpeIおよびNruIで消化後、アガロースゲル電気泳動を行い、SpeI-NruI処理pWH1520断片を取得した。

【0153】

上記で取得されたSpeI-BamHI処理DNA断片(配列番号17と18、19と20、23と24、25と26、27と28、および29と30のプライマーの組み合わせでPCR増幅)はSpeI-BamHI処理pWF1520断片と、SpeI-NruI処理DNA断片(配列番号21と22のプライマーの組み合わせでPCR増幅)はSpeI-NruI処理pWF1520断片と、それぞれ混合した後、エタノール沈殿を行い、得られたDNA沈殿物を5 μ lの蒸留水に溶解

し、ライゲーション反応を行うことにより組換え体DNAを各々取得した。

【0154】

該組換え体DNAを用い、*E. coli* (東洋紡より購入) DH5 α 株を常法に従って形質転換後、テトラサイクリン10 μ g/mlを含むLB寒天培地に塗布し、25 $^{\circ}$ Cで2日間培養した。

得られた培養液を遠心分離することにより菌体を取得した。

【0155】

該菌体より常法に従ってプラスミドを単離した。

該方法により単離したプラスミドを各種制限酵素で切断して構造を調べ、塩基配列を決定することにより、目的のDNA断片が挿入されているプラスミドであることを確認した。配列番号17と18のプライマーの組みあわせでPCR増幅したDNA断片をpWH1520に連結して得られたプラスミドをpWbioI、配列番号19と20のプライマーの組みあわせでPCR増幅したDNA断片をpWH1520に連結して得られたプラスミドをpWcypA、配列番号21と22のプライマーの組みあわせでPCR増幅したDNA断片をpWH1520に連結して得られたプラスミドをpWcypX、配列番号23と24のプライマーの組みあわせでPCR増幅したDNA断片をpWH1520に連結して得られたプラスミドをpWpksS、配列番号25と26のプライマーの組みあわせでPCR増幅したDNA断片をpWH1520に連結して得られたプラスミドをpWyeto、配列番号27と28のプライマーの組みあわせでPCR増幅したDNA断片をpWH1520に連結して得られたプラスミドをpWyjiB、配列番号29と30のプライマーの組みあわせでPCR増幅したDNA断片をpWH1520に連結して得られたプラスミドをpWy rhJとそれぞれ命名した。

こうして得られたプラスミドおよびベクタープラスミドpWH1520をS.Chang and S.N.Cohen[S.Chang and S.N.Cohen: Mol.Gen.Genet., 168, 111 (1979)]らの方法に従ってBacillus subtilis ATCC33712株に導入した。

【0156】

即ち、ATCC33712株を5mlのPen培地(Difco Antibiotic medium No.3 1.75gを水100mlに溶解し、オートクレーブ滅菌したもの)が入った太試験管に植菌し

、37℃で一晩振盪培養した。次にPen培地100mlが入った300ml三角フラスコに一晩培養した菌体を全量植菌し、37℃で3時間振盪培養することで対数増殖期中期まで生育させた。滅菌した遠沈管に移し、5000rpm、10分遠心することで菌体を沈殿させた。上清を除いた後、4.5mlのSMMP[×2 SMMP(ショ糖 34.2g、マレイン酸 0.464g、塩化マグネシウム・6水和物 0.813gを水に溶かし水酸化ナトリウムでpH6.5に調整後、100mlとしてオートクレーブ滅菌したもの)と×4 Pen培地(Difco Antibiotic medium No.3 7gを水100mlに溶解し、オートクレーブ滅菌したもの)の等量混合物]に懸濁し、リゾチーム溶液[リゾチーム(生化学工業) 10mgを0.5mlのSMMPに溶解させ、ポアサイズ0.45 μ mのミリポアフィルターでフィルター滅菌したもの]を0.5ml加え、37℃でゆっくり、2時間振盪した。顕微鏡で90%以上の細胞がプロトプラスト化していることを確認した後、3000rpm、20分遠心することでプロトプラストを沈殿させ、上清を除き、5mlのSMMPに再懸濁した。再度3000rpm、20分遠心してプロトプラストを集め、SMMP 2mlに懸濁して、形質転換の受容菌のプロトプラスト懸濁液とした。

【0157】

プラスミドDNA約1 μ gをSMMPに溶解し、プロトプラスト懸濁液0.5mlとよく混合した。混合してすぐに40%ポリエチレングルコール液[ポリエチレングルコール600(ナカライテスク) 40gを×2 SMMPに溶かし、水で100mlにした後、オートクレーブ滅菌したもの]1.5mlを加え良く混合した。室温で2分放置後、5mlのSMMPを加えて混合し、3000rpm、20分遠心した。上清を除いた後、沈殿したプロトプラストに1mlのSMMPを加えて懸濁し、30℃で3時間ゆっくり振盪した。SMMPで適当に希釈した後、薬剤(テトラサイクリンの場合、10 μ g/mlになるように加えた)の入ったDM3培地[バクトアガー(ディフコ社製) 80g/Lを45ml、カザミノ酸 50g/Lを50ml、コハク酸ナトリウム・6水和物 338g/L pH7.3を250ml、リン酸緩衝液(リン酸水素二カリウム 35g/L、リン酸二水素カリウム 15g/L)を50ml、酵母エキス 100g/Lを25ml、塩化マグネシウム・6水和物 203g/Lを10ml、グルコース 100g/Lを25ml、それぞれオートクレーブ滅菌した後、混合し、0.45 μ mのミリポアフィルターでフィルター滅菌したウシ血清アルブミン 20mg/mlを3.5ml加えたもの]に塗布した。37℃で1~2日間培養することで形質転換株を得ることができた。

【0158】

このようにして上記各プラスミドを有する *B. subtilis* ATCC33712株を取得した。

得られた形質転換体およびプラスミドを導入していないATCC33712株をそれぞれLB液体培地3ml（プラスミド保有株に対してはテトラサイクリン10mg/lを添加）に植菌し30℃で24時間振とう培養した。この培養液0.25 mlをTB培地〔バクトトリプトン（ディフコ社製）1.4%、バクトイーストエキストラクト（ディフコ社製）2.4%、 KH_2PO_4 0.231%、 K_2HPO_4 1.251%、1 N水酸化ナトリウムでpH 7.4に調整〕5mlを含む試験管に植菌し30℃で3時間振盪培養した。3時間後に培養液1 mlをアシストチューブNo.60.540S（アシスト社製）に移し、滅菌した50%キシロース溶液を40 μ lを添加し、さらに3時間振盪培養した後、実施例1で得た化合物（VII-a）（Rがナトリウムである化合物）を終濃度が0.2 mg/mlになるようにそれぞれの試験管に添加し、さらに16時間30℃で振盪して反応を行なった。

【0159】

反応終了後、反応液を酢酸でpH3.5に調整した。この反応液0.5mlに酢酸エチル1 mlを加え、1時間振盪した。振盪後、3000rpm、5分間の遠心分離によって反応液を2相に分け、上清の酢酸エチル層を回収し、遠心エバポレーターで溶媒を除去した後、残渣をメタノール0.5mlに溶解した。

このメタノール溶液の一部を用いて実施例1と同様にHPLC分析を行ない、化合物（VIII-a）（式中Rはナトリウムである化合物）の検出、定量を行なった。結果を表2に示す。

【0160】

【表 2】

表 2

| プラスミド | 化合物 (VIII-a) (mg/l) |
|---------|---------------------|
| なし | 0.5 |
| pWH1520 | 0.5 |
| pWbiol | 0.5 |
| pWcypA | 0.5 |
| pWcypX | 0.5 |
| pWpksS | 0.5 |
| pWyet0 | 0.5 |
| pWyjiB | 24.6 |
| pWyrhJ | 0.5 |

実施例 1、2 の結果より、yjiB 遺伝子に化合物 (VII-a) または化合物 (VII-b) から化合物 (VIII-a) または化合物 (VIII-b) を生成する活性がコードされていることは明らかである。

実施例 3

【0161】

実施例 2 で作成した pWyjiB を実施例 2 に記載した枯草菌の形質転換法と同様の方法で、Bacillus megaterium (MoBiTec 社製) および Bacillus sp. FERM BP-603 0 に導入した。

得られた形質転換体およびプラスミドを持たない宿主を、実施例 2 と同様に培養、反応し、生成した化合物 (VIII-a) の量を測定した。結果を表 3 に示す。

【0162】

【表 3】

表 3

| 宿主 | プラスミド | 化合物 (VIII-a) (mg/l) |
|----------------------|--------|---------------------|
| <u>B. megaterium</u> | なし | 2.0 |
| " | pWyjiB | 27.2 |
| FERM BP-6030 | なし | 4.5 |
| " | pWyjiB | 30.3 |

【発明の効果】

【0163】

本願発明により、新規な水酸化酵素をコードするDNAおよびヒドロキシメチルグルタリルCoA (HMG-CoA) レダクターゼを阻害し、血清コレステロールの低下作用を有する化合物を効率的に製造できる。

【0 1 6 4】

「配列表フリーテキスト」

配列番号 3 : 合成DNA

配列番号 4 : 合成DNA

配列番号 5 : 合成DNA

配列番号 6 : 合成DNA

配列番号 7 : 合成DNA

配列番号 8 : 合成DNA

配列番号 9 : 合成DNA

配列番号 10 : 合成DNA

配列番号 11 : 合成DNA

配列番号 12 : 合成DNA

配列番号 13 : 合成DNA

配列番号 14 : 合成DNA

配列番号 15 : 合成DNA

配列番号 16 : 合成DNA

配列番号 17 : 合成DNA

配列番号 18 : 合成DNA

配列番号 19 : 合成DNA

配列番号 20 : 合成DNA

配列番号 21 : 合成DNA

配列番号 22 : 合成DNA

配列番号 23 : 合成DNA

配列番号 24 : 合成DNA

配列番号 25 : 合成DNA

配列番号 2 6 : 合成 D N A

配列番号 2 7 : 合成 D N A

配列番号 2 8 : 合成 D N A

配列番号 2 9 : 合成 D N A

配列番号 3 0 : 合成 D N A

【0 1 6 5】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD

<120> A Process for producing HMG-CoA Reductase inhibitor

<130> H11-0011T4

<140>

<141>

<160> 30

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 396

<212> PRT

<213> Bacillus subtilis

<400> 1

Met Asn Val Leu Asn Arg Arg Gln Ala Leu Gln Arg Ala Leu Leu Asn

1

5

10

15

Gly Lys Asn Lys Gln Asp Ala Tyr His Pro Phe Pro Trp Tyr Glu Ser

20

25

30

Met Arg Lys Asp Ala Pro Val Ser Phe Asp Glu Glu Asn Gln Val Trp

35

40

45

Ser Val Phe Leu Tyr Asp Asp Val Lys Lys Val Val Gly Asp Lys Glu

50

55

60

Leu Phe Ser Ser Cys Met Pro Gln Gln Thr Ser Ser Ile Gly Asn Ser

65

70

75

80

Ile Ile Asn Met Asp Pro Pro Lys His Thr Lys Ile Arg Ser Val Val

85

90

95

Asn Lys Ala Phe Thr Pro Arg Val Met Lys Gln Trp Glu Pro Arg Ile

100

105

110

Gln Glu Ile Thr Asp Glu Leu Ile Gln Lys Phe Gln Gly Arg Ser Glu

115

120

125

Phe Asp Leu Val His Asp Phe Ser Tyr Pro Leu Pro Val Ile Val Ile

130

135

140

Ser Glu Leu Leu Gly Val Pro Ser Ala His Met Glu Gln Phe Lys Ala

145

150

155

160

Trp Ser Asp Leu Leu Val Ser Thr Pro Lys Asp Lys Ser Glu Glu Ala

165

170

175

Glu Lys Ala Phe Leu Glu Glu Arg Asp Lys Cys Glu Glu Glu Leu Ala

180

185

190

Ala Phe Phe Ala Gly Ile Ile Glu Glu Lys Arg Asn Lys Pro Glu Gln

195

200

205

Asp Ile Ile Ser Ile Leu Val Glu Ala Glu Glu Thr Gly Glu Lys Leu

210

215

220

Ser Gly Glu Glu Leu Ile Pro Phe Cys Thr Leu Leu Leu Val Ala Gly

225

230

235

240

Asn Glu Thr Thr Thr Asn Leu Ile Ser Asn Ala Met Tyr Ser Ile Leu

245

250

255

Glu Thr Pro Gly Val Tyr Glu Glu Leu Arg Ser His Pro Glu Leu Met

260

265

270

Pro Gln Ala Val Glu Glu Ala Leu Arg Phe Arg Ala Pro Ala Pro Val

275

280

285

Leu Arg Arg Ile Ala Lys Arg Asp Thr Glu Ile Gly Gly His Leu Ile

290

295

300

Lys Glu Gly Asp Met Val Leu Ala Phe Val Ala Ser Ala Asn Arg Asp

305

310

315

320

Glu Ala Lys Phe Asp Arg Pro His Met Phe Asp Ile Arg Arg His Pro

325

330

335

Asn Pro His Ile Ala Phe Gly His Gly Ile His Phe Cys Leu Gly Ala
340 345 350

Pro Leu Ala Arg Leu Glu Ala Asn Ile Ala Leu Thr Ser Leu Ile Ser
355 360 365

Ala Phe Pro His Met Glu Cys Val Ser Ile Thr Pro Ile Glu Asn Ser
370 375 380

Val Ile Tyr Gly Leu Lys Ser Phe Arg Val Lys Met
385 390 395

<210> 2

<211> 1191

<212> DNA

<213> *Bacillus subtilis*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1191)

<400> 2

atg aat gtg tta aac cgc cgg caa gcc ttg cag cga gcg ctg ctc aat 48
Met Asn Val Leu Asn Arg Arg Gln Ala Leu Gln Arg Ala Leu Leu Asn
1 5 10 15

ggg aaa aac aaa cag gat gcg tat cat ccg ttt cca tgg tat gaa tcg 96
Gly Lys Asn Lys Gln Asp Ala Tyr His Pro Phe Pro Trp Tyr Glu Ser
20 25 30

atg aga aag gat gcg cct gtt tcc ttt gat gaa gaa aac caa gtg tgg 144
Met Arg Lys Asp Ala Pro Val Ser Phe Asp Glu Glu Asn Gln Val Trp
35 40 45

agc gtt ttt ctt tat gat gat gtc aaa aaa gtt gtt ggg gat aaa gag 192
Ser Val Phe Leu Tyr Asp Asp Val Lys Lys Val Val Gly Asp Lys Glu
50 55 60

ttg ttt tcc agt tgc atg ccg cag cag aca agc tct att gga aat tcc 240
Leu Phe Ser Ser Cys Met Pro Gln Gln Thr Ser Ser Ile Gly Asn Ser
65 70 75 80

atc att aac atg gac ccg ccg aag cat aca aaa atc cgt tca gtc gtg 288
Ile Ile Asn Met Asp Pro Pro Lys His Thr Lys Ile Arg Ser Val Val
85 90 95

aac aaa gcc ttt act ccg cgc gtg atg aag caa tgg gaa ccg aga att 336
Asn Lys Ala Phe Thr Pro Arg Val Met Lys Gln Trp Glu Pro Arg Ile
100 105 110

caa gaa atc aca gat gaa ctg att caa aaa ttt cag ggg cgc agt gag 384
Gln Glu Ile Thr Asp Glu Leu Ile Gln Lys Phe Gln Gly Arg Ser Glu
115 120 125

ttt gac ctt gtt cac gat ttt tca tac ccg ctt ccg gtt att gtg ata 432
Phe Asp Leu Val His Asp Phe Ser Tyr Pro Leu Pro Val Ile Val Ile
130 135 140

| | |
|--|-----|
| tct gag ctg ctg gga gtg cct tca gcg cat atg gaa cag ttt aaa gca | 480 |
| Ser Glu Leu Leu Gly Val Pro Ser Ala His Met Glu Gln Phe Lys Ala | |
| 145 150 155 160 | |
| tgg tct gat ctt ctg gtc agt aca ccg aag gat aaa agt gaa gaa gct | 528 |
| Trp Ser Asp Leu Leu Val Ser Thr Pro Lys Asp Lys Ser Glu Glu Ala | |
| 165 170 175 | |
| gaa aaa gcc ttt ttg gaa gaa cga gat aag tgt gag gaa gaa ctg gcc | 576 |
| Glu Lys Ala Phe Leu Glu Glu Arg Asp Lys Cys Glu Glu Glu Leu Ala | |
| 180 185 190 | |
| gcg ttt ttt gcc ggc atc ata gaa gaa aag cga aac aaa ccg gaa cag | 624 |
| Ala Phe Phe Ala Gly Ile Ile Glu Glu Lys Arg Asn Lys Pro Glu Gln | |
| 195 200 205 | |
| gat att att tct att tta gtg gaa gcg gaa gaa aca ggc gag aag ctg | 672 |
| Asp Ile Ile Ser Ile Leu Val Glu Ala Glu Glu Thr Gly Glu Lys Leu | |
| 210 215 220 | |
| tcc ggt gaa gag ctg att ccg ttt tgc acg ctg ctg ctg gtg gcc gga | 720 |
| Ser Gly Glu Glu Leu Ile Pro Phe Cys Thr Leu Leu Leu Val Ala Gly | |
| 225 230 235 240 | |
| aat gaa acc act aca aac ctg att tca aat gcg atg tac agc ata tta | 768 |
| Asn Glu Thr Thr Thr Asn Leu Ile Ser Asn Ala Met Tyr Ser Ile Leu | |
| 245 250 255 | |
| gaa acg cca ggc gtt tac gag gaa ctg cgc agc cat cct gaa ctg atg | 816 |

Glu Thr Pro Gly Val Tyr Glu Glu Leu Arg Ser His Pro Glu Leu Met
260 265 270

cct cag gca gtg gag gaa gcc ttg cgt ttc aga gcg ccg gcc ccg gtt 864
Pro Gln Ala Val Glu Glu Ala Leu Arg Phe Arg Ala Pro Ala Pro Val
275 280 285

ttg agg cgc att gcc aag cgg gat acg gag atc ggg ggg cac ctg att 912
Leu Arg Arg Ile Ala Lys Arg Asp Thr Glu Ile Gly Gly His Leu Ile
290 295 300

aaa gaa ggt gat atg gtt ttg gcg ttt gtg gca tgc gca aat cgt gat 960
Lys Glu Gly Asp Met Val Leu Ala Phe Val Ala Ser Ala Asn Arg Asp
305 310 315 320

gaa gca aag ttt gac aga ccg cac atg ttt gat atc cgc cgc cat ccc 1008
Glu Ala Lys Phe Asp Arg Pro His Met Phe Asp Ile Arg Arg His Pro
325 330 335

aat ccg cat att gcg ttt ggc cac ggc atc cat ttt tgc ctt ggg gcc 1056
Asn Pro His Ile Ala Phe Gly His Gly Ile His Phe Cys Leu Gly Ala
340 345 350

ccg ctt gcc cgt ctt gaa gca aat atc gcg tta acg tct ttg att tct 1104
Pro Leu Ala Arg Leu Glu Ala Asn Ile Ala Leu Thr Ser Leu Ile Ser
355 360 365

gct ttt cct cat atg gag tgc gtc agt atc act ccg att gaa aac agt 1152
Ala Phe Pro His Met Glu Cys Val Ser Ile Thr Pro Ile Glu Asn Ser

370

375

380

gtg ata tac gga tta aag agc ttc cgt gtg aaa atg taa

1191

Val Ile Tyr Gly Leu Lys Ser Phe Arg Val Lys Met

385

390

395

<210> 3

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 3

tttggatccg aattcaaaag tgcctggcgct gttccgttt

39

<210> 4

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 4

gtgggatccg tgcaccactt ttttcacgat gttcactccc c

41

<210> 5

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 5

ccaggatcct ctagatgggtg aaatggttgt tgccgctct

39

<210> 6

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 6

tcaggatccc ccgggtgagc ggcaaatcca cccaccctg

39

<210> 7

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 7

taagcgcgcc ccgggttaat tggatgggcg aaagctc

37

<210> 8

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 8

atcgcgcgcg tcgacgatag cggcagaaaa ttggcggca

39

<210> 9

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 9

agcggatccg aattcgctgg aatcaaaagt cgccaga

38

<210> 10

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 10

tcaggatccg tcgactgaga aaacacaaac gccccctc

38

<210> 11

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 11

atgggatccct ctgacatgt tgtagtttgg gttggaatc

39

<210> 12

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 12

gccggatcca gatctggcat cacacaacaa taaatacacc gc

42

<210> 13

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 13

tctggatcct ctagaagaga acacaaagag tacgaatgc

39

<210> 14

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 14

aaaggatccc ccgggtttac cagccagcgc aacaaagtca t

41

<210> 15

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 15

cctgaattct ctagaaggct ttcaccacgt attttgctg

39

<210> 16

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 16

tctgaattcc ccgggagaac aaaatgccaa aagcctgagtc

41

<210> 17

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 17

aatactagta caattgcatc gtcaactgca tctt

34

<210> 18

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 18

gtgggatccg tcgaccactt ttttcacgat gttcactccc c

41

<210> 19

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 194

gaaactagtt ctccaaga aaaaaagagt gtae

34

<210> 20

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 20

tcaggatccc ccgggtgagc ggcaaatcca cccaccctg

39

<210> 21

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 21

taaactagta gccaatcgat taaattgttt agtg

34

<210> 22

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 22

ggaggtacct tatgccccgt caaacgcaac gaga

34

<210> 23

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 23

aggactagtc aaatggaaaa attgatgttt catc

34

<210> 24

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 24

tcaggatccg tcgactgaga aaacacaaac gccccctc

38

<210> 25

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 25

ggtactagta aggaaacaag cccgattcct cagc

34

<210> 26

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 26

gccggatcca gatctggcat cacacaaca taaatacacc gc

42

<210> 27

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 27

ttggatccac tagtaatgtg ttaaaccgcc ggcaagcc

38

<210> 28

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 28

aaaggatccc ccgggtttac cagccagcgc aacaaagtca t

41

<210> 29

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 29

atgactagta aacaggcaag cgcaatacct cagc

34

<210> 30

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 30

tttggtacct tacattcctg tccaaacgtc tttc

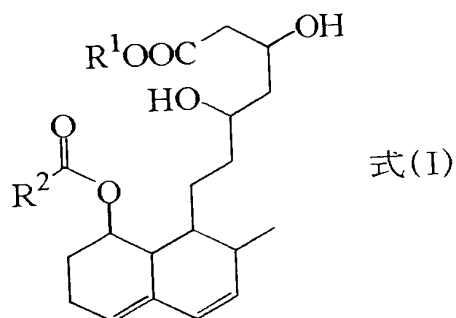
34

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 新規な水酸化酵素をコードするDNAおよび、HMG-CoAレダクターゼを阻害し、血清コレステロールの低下作用を有する化合物の工業的に有利な製造法を提供する。

【解決手段】 Bacillus属に属する微生物由来でかつ、式(I)



(式中、 R^1 は水素原子、置換もしくは非置換のアルキルまたはアルカリ金属を表し、 R^2 は置換もしくは非置換のアルキルまたはアリールを表す)で表される化合物[以下、化合物(I-a)という]またはその閉環ラクトン体を水酸化する活性を有する蛋白質をコードするDNAを含む組換えDNAベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換体、該形質転換体の培養物または該培養物の処理物を酵素源として化合物(I-a)またはその閉環ラクトン体に水性媒体中で作用させ、該水性媒体から化合物(I-a)またはその閉環ラクトン体の水酸化物を採取する。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000001029]

1. 変更年月日 1990年 8月 6日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都千代田区大手町1丁目6番1号

氏 名 協和醗酵工業株式会社

